HISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON OXYDOREDUKTASEN IM MENSCHLICHEN OVAR

Wolfgang Röhm

1969

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Direktor: Professor Dr.med. Hans Roemer

HISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON OXYDOREDUKTASEN IM MENSCHLICHEN OVAR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Röhm
aus Stuttgart
1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. J. Hirschmann
1. Berichterstatter:	Dozent Dr. P.A. König
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Roemer

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK · 8 München 13 · Telefon 52 46 07

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	2
3.	Biochemie der Oxydoreduktionsvorgänge	4
3.1	Einteilung der Oxydoreduktasen	4
3.2	Bedeutung der Oxydoreduktasen im Stoffwechsel	5
3.21	Der Energiestoffwechsel	5
3.22	Oxydationsvorgänge, die primär nicht der Energiegewinnung dienen	10
3.221	Der Pentosephosphatcyclus	10
3.222	Die Biosynthese der Steroidhormone	11
4.	Histochemie der Oxydoreduktasen	13
4.1	Allgemeine Probleme der Enzymhistochemie	13
4.11	Das biokatalytische System	13
4.12	Allgemeine Methodik	15
	A. Untersuchungsmaterial	15
	B. Vorbereitung des Gewebes	16
	C. Schutz der Mitochondrien	17
	D. Zur Frage einer cytochemischen Enzymlokalisation	17
4.2	Histochemie der Oxydasen	19
4.21	Cytochromoxydase	19
4.211	Biochemie	19
4.212	Histochemie	21
4.213	Bisherige Befunde im Ovar	23
4.214	Methodik	24
4.215	Ergebnisse	25
4.22	Monoaminoxydase	27

Seite

4.221 Biochemie 27
4.222 Histochemie 28
4.223 Bisherige Befunde im Ovar 29
4.224 Methodik 30
4.225 Ergebnisse 30

4.3 Histochemie der Dehydrogenasen 32

4.31 Allgemeine Methodik 32
4.311 Die Tetrazoliumsalze 32
A. Substantivität des Nitro-BT für Lipoproteine 34
B. Cobaltchelatbildung des MTT 35
C. Fettlöslichkeit des MTT 35
D. Verunreinigung des Nitro-BT mit Monotetrazolen 35
4.312 Allgemeine Probleme der Dehydrogenasenhistochemie 36
A. Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichts 36
B. Zusatz von Coenzymen zum Inkubationsmedium 38
C. Blockierung des natürlichen Elektronenwegs 39
D. Enzymspezifität der Dehydrogenasenreaktion 39
E. Unspezifische Reduktion der Tetrazoliumsalze 41

4.32 Succino-Dehydrogenase (Bernsteinsäure-Dehydrogenase) 42
4.321 Biochemie 42
4.322 Histochemie 43
4.323 Bisherige Befunde im Ovar 45
4.324 Methodik 47
4.325 Ergebnisse 47

4.33 Diaphorasen 49
4.331 Biochemie 49
4.332 Histochemie 51
4.333 Bisherige Befunde im Ovar 51
4.334 Methodik 53
4.335 Ergebnisse 54

4.34 Pyridinnucleotidgebundene Dehydrogenasen 55
4.341 Biochemie 56
A. Alkohol-Dehydrogenase 56
B. α-Glycerophosphat-Dehydrogenase 57
C. Milchsäure-Dehydrogenase 57
D. Äpfelsäure-Dehydrogenase 58
E. Isocitronensäure-Dehydrogenase 58

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

F. Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase 58
G. β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase 59
H. Glutaminsäure-Dehydrogenase 59
4.342 Bisherige Befunde im Ovar 59
4.343 Methodik 60
4.344 Ergebnisse 64
A. Enzyme mit hoher Aktivität 64
B. Enzyme mit mittlerer Aktivität 66
C. Enzyme ohne nachweisbare Aktivität 67
4.35 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 68
4.351 Methodik 68
4.352 Ergebnisse 69
4.36 Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 70
4.361 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase 70
4.3611 Biochemie 70
4.3612 Histochemie 71
4.3613 Bisherige Befunde im Ovar 74
4.3614 Methodik 75
4.3615 Ergebnisse 76
4.3616 Substratspezifität der 3ß-ol-Steroid-Dehydrogenase 77
4.362 17ß-ol-Steroid-Dehydrogenase 80
4.3621 Biochemie 80
4.3622 Methodik 80
4.3623 Ergebnisse 81

5. Diskussion 82
Versuch einer funktionellen Deutung der Befunde 91

6. Zusammenfassung 95

7. Literaturverzeichnis 96

1. Einleitung

Das Fachgebiet der Histochemie eröffnet durch die Verknüpfung morphologischer und biochemischer Erkenntnisse eine Möglichkeit, einzelnen Geweben, Zellen und Zellstrukturen bestimmte funktionelle Eigenschaften zuzuordnen. Eines der morphologisch faßbaren Äquivalente der Zellfunktion stellen die Enzyme dar, die als Katalysatoren in die Steuerung des Stoffwechsels eingreifen. Ihre Lokalisation im Gewebe läßt Rückschlüsse auf die Art der intrazellulär ablaufenden Stoffwechselreaktionen zu und gibt damit Hinweise sowohl auf die allgemeine Reaktionslage einer Zelle, als auch auf ihre spezifischen Leistungen. Da bislang kein Verfahren den direkten Nachweis von Enzymen erlaubt, werden in der Histochemie die Enzyme indirekt durch die Darstellung ihrer katalytischen Aktivität im Gewebe lokalisiert. Erste Untersuchungen dieser Art gehen auf KLEBS und STRUVE zurück. Im Jahre 1868 beschrieb KLEBS die Blaufärbung von Eiter nach Einwirkung von Guajaktinktur. Wenig später konnte STRUVE (1872) zeigen, daß in Blut, Speichel und anderen organischen Lösungen bei Zusatz von Pyrogallussäure gelbe Purpurogallinkristalle entstehen. Nach den heutigen Erkenntnissen beruhen diese Reaktionen auf der katalytischen Wirkung von Peroxydasen.

Im tierischen Organismus wurden enzymatisch gesteuerte Reduktions- und Oxydationsvorgänge mit histochemischen Mitteln erstmals von Paul EHRLICH (1885) untersucht. Die von ihm

beschriebene Indophenolblausynthese im Gewebe nach Injektion von α-Naphthol und NN-Dimethyl-p-phenylendiamin wird als "Nadi-Reaktion" noch heute zum Nachweis des Enzyms Cytochromoxydase verwandt. GRÄFF (1922) sah in dieser Methode bereits eine Möglichkeit zur Beurteilung der "Intensität des intrazellulären Stoffwechsels", die über die "oxydative Leistungsfähigkeit der lebenden Zelle" Aufschluß zu geben vermag. Eine solche Betrachtungsweise der Morphologie unter funktionellen Gesichtspunkten ist in der Histologie in jüngerer Zeit in den Vordergrund getreten und hat der enzymhistochemischen Forschung neue Impulse vermittelt. Exakte histochemische Methoden zum Nachweis und zur Lokalisation der Enzyme konnten jedoch erst erarbeitet werden, als die Biochemie durch die Erforschung der Wirkungsmechanismen und des Ablaufs der Stoffwechselvorgänge die Voraussetzungen für eine einwandfreie Deutung histochemischer Befunde geliefert hatte. Insgesamt lassen sich derzeit mit histochemischen Mitteln etwa 50 verschiedene Enzyme im Gewebe lokalisieren, wovon ein Drittel der Gruppe der Oxydoreduktionsfermente zugehört.

2. Problemstellung

In dieser Arbeit werden mit den Mitteln der Enzymhistochemie Vorkommen und Verteilung von 18 Enzymen aus der Gruppe der Oxydoreduktasen in den geweblichen Strukturen des menschlichen Ovars untersucht. Das Versuchsmaterial umfaßt 54 operativ entfernte Ovarien, Menstruations- und Schwangerschaftsgelbkörper von Patientinnen im geschlechtsreifen

Alter aus dem Krankengut der Universitätsfrauenklinik Tübingen.

Da das Ovar ständig zyklisch ablaufenden Umwandlungsprozessen unterworfen ist, kann es als geeignetes Untersuchungsobjekt gelten, um die Wechselwirkungen zwischen enzymatischer Aktivität und zellulärer Funktion zu studieren. Entsprechend der unterschiedlichen Verteilung der untersuchten Enzyme in den einzelnen Gewebsformationen des Ovars, läßt sich für jede Zellart ein spezifisches Enzymprofil aufstellen. Innerhalb der durch die Methodik gesetzten Grenzen wird versucht, hieraus Aussagen über das funktionelle Geschehen im Ovar abzuleiten. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Frage nach den Bildungsstätten der spezifischen Ovarialhormone.

3. Biochemie der Oxydoreduktionsvorgänge

3.1 Einteilung der Oxydoreduktasen

Das wesentliche Merkmal der Oxydation ist nach heutiger Auffassung ein Elektronenverlust des oxydierten Substrats. Dieser Vorgang kann entweder isoliert erfolgen, oder aber in Zusammenhang mit einer Sauerstoffaufnahme oder einer Wasserstoffabgabe. In der Zelle ist jede dieser drei möglichen Formen der Substratoxydation verwirklicht. Dementsprechend lassen sich drei Hauptgruppen von Oxydationsfermenten unterscheiden, die in ihrer Gesamtheit als Oxydoreduktasen bezeichnet werden:

a) Transelektronasen

b) Oxydasen

c) Dehydrogenasen.

Die Oxydationswirkung der Transelektronasen besteht in einer alleinigen Elektronenübertragung von dem zu oxydierenden Substrat auf eine Akzeptorsubstanz, die hierbei in den Reduktionszustand übergeht. In diese Enzymklasse gehören unter anderem die Cytochrome der Atmungskette.

Die Gruppe der Oxydasen umfaßt diejenigen Fermente, die zu einer direkten Reaktion mit molekularem Sauerstoff befähigt sind . Ein histochemisch faßbarer Vertreter dieser autoxydablen Fermente ist die Cytochromoxydase.

Die katalytische Aktivität der Dehydrogenasen ist von der Mitwirkung sogenannter Coenzyme abhängig. Die Dehydrierung stellt die häufigste Form der Substratoxydation im Organis-

mus dar und ist durch die Abspaltung von jeweils zwei Wasserstoffatomen gekennzeichnet. Die wasserstoffübertragenden Enzyme, nach der Nomenklatur von HOFFMANN-OSTENHOF (1953) als Transhydrogenasen bezeichnet, lassen sich nach ihren Cofermenten in drei große Klassen einteilen:

a) Diphosphopyridinnucleotid-(DPN)-abhängige Dehydrogenasen
b) Triphosphopyridinnucleotid-(TPN)-abhängige Dehydrogenasen
c) Gelbe Enzyme (Flavoproteine) mit Flavinadeninnucleotiden als Wirkgruppe.

Während die pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen mit ihren prosthetischen Gruppen eine leicht dissoziierbare Bindung eingehen, liegen die Flavoproteine bei physiologischem pH-Wert in undissoziierter Form vor.

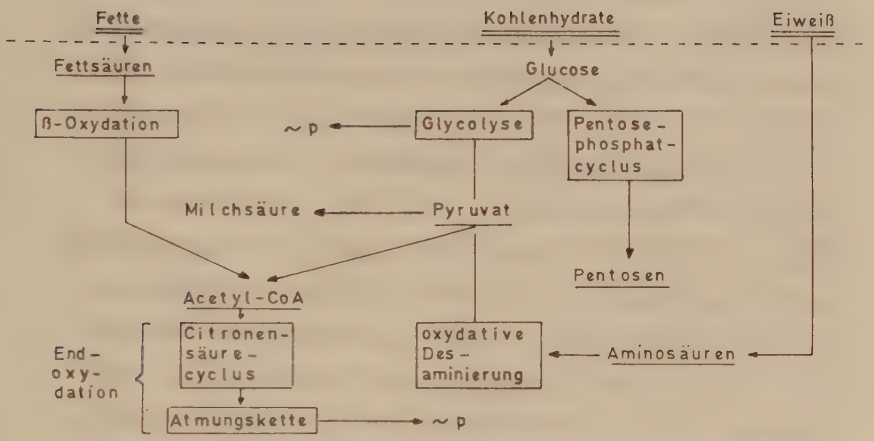
3.2 Bedeutung der Oxydoreduktasen im Stoffwechsel

3.21 Der Energiestoffwechsel

Die Hauptaufgabe oxydativer Prozesse im Stoffwechsel der Zelle ist die Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge durch die Bereitstellung chemisch gespeicherter Energie. Entsprechende oxydativ aktive, der Energiegewinnung dienende Enzymsysteme sind daher in jeder Zelle angelegt. Die Energieproduktion selbst erfolgt stufenweise in zahlreichen oxydativen Einzelreaktionen, die zusammen als biologische Oxydation bezeichnet werden. Um eine Koordinierung der beteiligten Enzyme zu erreichen, ist in der Zelle jeweils eine bestimmte Anzahl von Einzelenzymen zu besonderen Funktionseinheiten, sogenannten multikatalytischen Systemen zusammengefaßt. Erst das geordnete Zusammenwirken dieser Enzymketten

ermöglicht einen normalen Ablauf des Intermediärstoffwechsels. Diese Zusammenhänge müssen bei der Deutung enzymhistochemischer Befunde mitberücksichtigt werden; das Einzelenzym ist also immer auch im größeren Rahmen des zugehörigen multikatalytischen Systems und der Gesamtregulation zu beurteilen. Im folgenden wird daher Funktion und Korrelation der am Energiestoffwechsel beteiligten Enzymketten zusammenfassend dargestellt.

Der Energiebedarf im tierischen Organismus wird vorwiegend aus dem Abbau von Kohlenhydraten und Fetten gedeckt. Die Aufspaltung von Glucose und Fettsäuren in Kohlendioxyd und Wasser in der biologischen Oxydation wird durch eine Gruppe von multikatalytischen Systemen gesteuert, deren wichtigste die Glycolyse, der Pentosephosphatcyclus, der Citronensäurecyclus, die Atmungskette und die β-Oxydation der Fettsäuren sind. Die Koordination dieser Enzymketten ist in einem vereinfachten Schema in Übersicht 1 wiedergegeben. Der Abbau der Kohlenhydrate läuft zunächst anaerob, dann in einer aeroben Phase ab. In der Glycolyse, dem anaeroben Abschnitt, wird Glucose unter relativ geringer Energiefreisetzung bis zur Stufe der Brenztraubensäure aufgespalten und bei ausreichendem Sauerstoffangebot über Essigsäure weiter abgebaut. Bei Sauerstoffmangel ist die Zelle in verstärktem Maße auf die anaerobe Energieproduktion der Glycolyse angewiesen. Die anfallende Brenztraubensäure wird unter diesen Bedingungen nicht mehr zu Essigsäure decarboxyliert, sondern in einer alternativen Reaktion zu Milchsäure reduziert (Pasteur-Effekt).



Übersicht 1: Oxydative Abbauwege der Nahrungsstoffe. (In Anlehnung an RICHTERICH, 1958). Die multikatalytischen Systeme sind durch Umrandung gekennzeichnet.
~P: Bildung von energiereichem Phosphat.

Der weitere Abbau der Essigsäure findet in der sogenannten Endoxydation der Nahrungsstoffe statt. Unter diesem Oberbegriff faßt man die fermentativen Reaktionen des Citronensäurecyclus und der Atmungskette zusammen. Diese beiden grossen multikatalytischen Systeme sind nicht nur funktionell, sondern durch ihre Lokalisation in den Mitochondrien auch räumlich eng miteinander verknüpft.

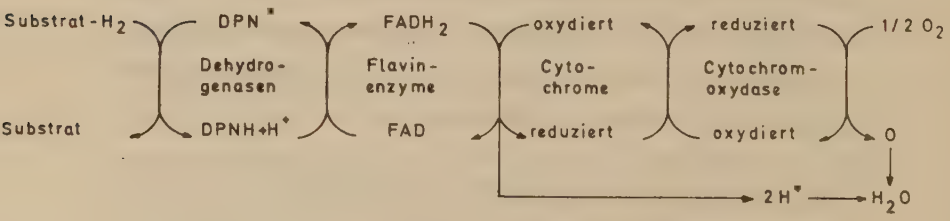
Eine zentrale Stellung im gesamten Stoffwechsel nimmt der Citronensäurecyclus ein. In ihn münden die zu Beginn getrennt verlaufenden Abbauwege

a) der Kohlenhydrate über die Glycolyse

b) der Fette über die ß-Oxydation der Fettsäuren und

c) des Eiweißstoffwechsels über die oxydative Desaminierung von Aminosäuren.

Insgesamt fließen etwa zwei Drittel des Kohlenstoffs der Kohlenhydrate, der gesamte Kohlenstoff der Fettsäuren und die Hälfte des Kohlenstoffs der Aminosäuren über die Zwischenstufe der aktivierten Essigsäure (Acetyl-Coenzym A) in den Citronensäurecyclus ein (KREBS u. LOWENSTEIN, 1960). Der weitere Abbauprozeß, die schrittweise, vollständige Dehydrierung der Essigsäure, erfolgt dann für alle Nahrungsstoffe gemeinsam über dieses eine multikatalytische System. Der im Citronensäurecyclus abgespaltene Wasserstoff tritt anschließend in der Atmungskette nach dem Prinzip der Knallgasreaktion mit Sauerstoff unter Wasserbildung zusammen. Dieser Vorgang, der mit der Freisetzung großer Energiemengen verbunden ist, wird in der Zelle durch die Zwischenschaltung zahlreicher Redoxenzyme in eine Folge oxydativer Schritte mit jeweils geringer Energieausbeute unterteilt; es erfolgt eine "stufenweise Übertragung von Wasserstoff beziehungsweise Elektronen auf Sauerstoff" (MYRBÄCK, 1959). Die Übersicht 2 zeigt ein vereinfachtes Schema dieser Oxydationskette, die folgende teils extra-, teils intramitochondral ablaufende



Übersicht 2: Vereinfachtes Schema der Redoxvorgänge in der Atmungskette (FAD = Flavinadenindinucleotid). Modifiziert nach HARPER, H.A., 1959.

Einzelreaktionen einschließt: Die initiale Substratdehydrierung wird, mit einer wichtigen Ausnahme (FAD-abhängige Succinodehydrogenase), von pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen katalysiert, deren Coenzyme den abgespaltenen Wasserstoff aufnehmen. Die reduzierten Pyridinnucleotide dienen als Wasserstoffdonatoren für die zu den Flavoproteinen zählenden Diaphorasen. Diese Enzyme vermögen das Wasserstoffatom durch die Aufspaltung in Ion und Elektron zu aktivieren. Der weitere oxydative Weg besteht aus einer reinen Elektronenübertragung von den Diaphorasen über einige nicht näher bekannte Redoxverbindungen auf das Cytochromsystem. Das Endglied dieser Kette von hintereinandergeschalteten Haemoproteiden bildet die Cytochromoxydase, die als eine der wenigen Oxydoreduktasen autoxydabel ist. Sie vermag daher direkt mit molekularem Sauerstoff zu reagieren, den sie durch die Übertragung von Elektronen reduziert. Erst der auf diese Weise aktivierte Sauerstoff geht mit dem ionisierten Wasserstoff die Verbindung zu Wasser ein.

Der Vorteil dieser stufenweisen Oxydation liegt für die Zelle in einer günstigeren Ausnutzung und Regulierung der freiwerdenden Energie. Diese ist nämlich für den Organismus nur dann verwertbar, wenn es gelingt, sie in Form energiereicher Phosphatverbindungen nach Art des Adenosintriphosphats (ATP) chemisch zu speichern. Die hierzu notwendigen oxydativen Phosphorylierungsreaktionen können in begrenztem Umfang in der Glycolyse und im Citronensäurecyclus durchgeführt werden. Der entscheidende Energiegewinn mit einer großen Ausbeute an ATP findet jedoch in der Atmungskette statt.

3.22 Oxydationsvorgänge, die primär nicht der Energiegewinnung dienen

Eine Gruppe von Oxydationsfermenten ist primär nicht in den Energiestoffwechsel eingeschaltet. Ihre Funktion besteht vielmehr in der gezielten Veränderung der chemischen Struktur bestimmter Substrate im Zuge spezifischer Synthese- und Abbauvorgänge. Ihrer besonderen Aufgabe entsprechend, bleiben diese Enzyme meist auf einige hochspezialisierte Zelleinheiten beschränkt. Histochemisch nachweisbar sind aus dieser Enzymklasse bestimmte in die multikatalytischen Systeme des Pentosephosphatcyclus und der Steroidhormonsynthese eingebaute Dehydrogenasen.

3.221 Der Pentosephosphatcyclus

Während die DPN-abhängigen Dehydrogenasen ihren Wasserstoff vorwiegend an die Atmungskette zur Energiegewinnung weitergeben, ist der Wasserstoff der TPN-gebundenen Enzyme zu einem großen Teil für spezifische Syntheseschritte der Zelle bestimmt. Als Wasserstoffdonatoren sind TPNH-bildende Reaktionen bei der Fettsäure-, Cholesterin- und Steroidhormonsynthese unbedingt notwendig. Die wichtigste Bildungsstätte für das reduzierte TPN stellt der Pentosephosphatcyclus dar. Dieses multikatalytische System steuert einen oxydativen Abbauweg der Glucose, der unter Umgehung der Glycolyse neben größeren TPNH-Mengen auch noch andere hochwertige Verbindungen liefert, so etwa die Ribose als Baustein der Nucleinsäuren.

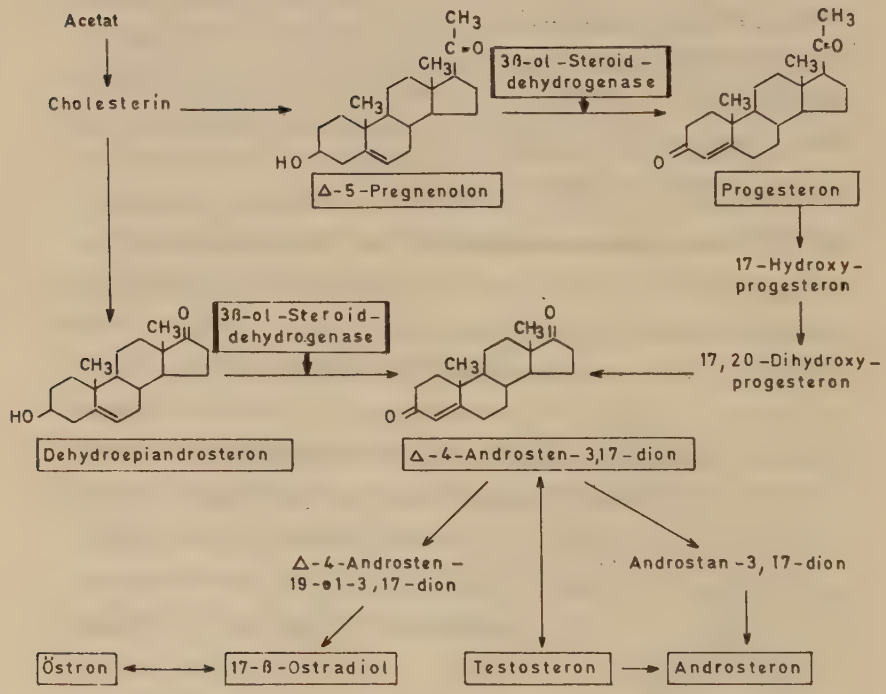
3.222 Die Biosynthese der Steroidhormone

Das komplexe Zusammenspiel der am Steroidhormonstoffwechsel beteiligten Reaktionen konnte bisher nur zu einem Teil aufgeklärt werden. Die Bedeutung einer großen Zahl von Zwischenprodukten,die aus Blut, Urin oder direkt aus hormonbildenden Geweben isoliert wurden, ist noch unbekannt. Im einzelnen soll hierauf im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Einige allgemeine Prinzipien der Steroidhormonsynthese werden jedoch im folgenden dargestellt.

Es gilt heute als wahrscheinlich, daß die erste Phase der Steroidsynthese in allen steroidhormonbildenden Geweben nach einem weitgehend einheitlichen Reaktionsschema abläuft. Hierbei kommt es zu einer Umwandlung von Cholesterin in Progesteron und Δ -4-Androsten-3,17-dion. Von den beiden letztgenannten Verbindungen ausgehend, erfolgt die eigentliche Differenzierung der Steroidhormone, wobei das von Organ zu Organ wechselnde Hormonspektrum durch Unterschiede in der Enzymausstattung der einzelnen Drüsen bedingt zu sein scheint . In Übersicht 3 sind die wichtigsten Synthesewege der Sexualhormone dargestellt.

Nach heutiger Auffassung besitzen alle sexualhormonbildenden Organe die notwendigen multikatalytischen Systeme und damit auch die Potenz, um sowohl Progesteron und Oestrogene, als auch Androgene zu bilden. Die Tatsache, daß jedes dieser endokrin aktiven Gewebe ein bestimmtes Hormon bevorzugt produziert, scheint "mehr ein quantitatives als ein qualitatives

Problem der entsprechenden Enzymsysteme" zu sein und läßt sich mit der "relativen Dominanz" eines bestimmten enzymatisch gesteuerten Synthesewegs in dem betreffenden Organ erklären (ZANDER, 1957).



Übersicht 3: Biosynthese der Sexualhormone.
(Nach HARPER (1959) - LEUTHARDT (1959) - SWEAT et al. (1960) - VANDE WIELE u. JAILER (1959).

Die Frage nach den Bildungsstätten der Steroidhormone im Gewebe kann heute noch nicht für alle Hormone mit Sicherheit beantwortet werden. Im Ovar sind die vielfältigen, in ständiger Umformung begriffenen endokrin aktiven Strukturen einer Analyse nur schwer zugänglich. Früher wurde der Nachweis von Lipoidsubstanzen in steroidhormonbildenden Organen als Zeichen der Steroidsynthese gewertet. Diese Methode konnte jedoch keine Klärung des Problems bringen, da die Bedeutung der Fettstoffe im Steroidstoffwechsel unklar und eine Beziehung zwischen Lipoidgehalt und hormoneller Aktivität eines Gewebes nicht erwiesen ist. Mit der histochemischen Darstellung der 3ß-ol-Steroiddehydrogenase wurde erstmals ein spezifisches morphologisches Äquivalent der Hormonsynthese faßbar.

4. Histochemie der Oxydoreduktasen

4.1 Allgemeine Probleme der Enzymhistochemie

4.11 Das biokatalytische System

Der Ablauf einer enzymatisch gesteuerten Reaktion ist von verschiedenen Faktoren abhängig, die hemmend oder aktivierend auf die Enzymaktivität einwirken. Hierfür wurde von RICHTERICH (1958) der Begriff des biokatalytischen Systems geprägt. Im einzelnen unterscheidet RICHTERICH folgende 4 große Faktorengruppen:

A. Enzymatische Faktoren

a) Enzymkonzentration

b) Coenzymkonzentration

c) Enzymatische Aktivatoren und Inhibitoren

d) Substratkonzentration

B. Milieu-Faktoren

a) Optimaler pH-Wert

b) Optimale Reaktionstemperatur

c) Wasser- und Elektrolytgehalt und Osmolarität der Zelle

C. Einflüsse auf Substrat und Reaktionsprodukt

a) Membranpermeabilität der Zellen und Zellorganellen

b) Einfluß des multikatalytischen Systems

D. Übergeordnete Regulationssysteme zur Steuerung der Enzyme

Als zusätzlicher Faktor kommt beim histochemischen Nachweis eines Enzyms das Enzymindikatorsystem hinzu.

Grundsätzlich kann jede der oben genannten Einflußmöglichkeiten zum limitierenden Faktor der Enzymreaktion werden. Die Folge ist eine Verminderung der Enzymaktivität. Da in der Histochemie eine möglichst optimale Enzymwirkung angestrebt wird, ist sowohl bei der Ausarbeitung als auch bei der Beurteilung einer enzymatischen Reaktion die Kenntnis der verschiedenartigen limitierenden Faktoren von grundlegender Wichtigkeit. Folglich ist in der Histochemie das entscheidende Problem beim Enzymnachweis, durch eine geeignete Zusammensetzung des Inkubationsmediums die Reaktionsbedingungen

so zu wählen, daß die maximale Enzymaktivität zum limitierenden Faktor des biokatalytischen Systems wird.

4.12 Allgemeine Methodik

A. Untersuchungsmaterial

Für den histochemischen Nachweis der Oxydoreduktasen wurden nur Ovarien ausgewählt, die von Patientinnen im geschlechtsreifen Alter mit erhaltener Periode stammten. Das Versuchsmaterial umfaßte einmal Ovarien, die bei gynäkologischen Operationen entfernt werden mußten, zum anderen Corpora lutea graviditatis, deren Exstirpation während der operativen Beendigung einer Schwangerschaft erfolgte.

Aus der erstgenannten Gruppe wurden insgesamt 38 Ovarien oder excidierte Corpora lutea menstruationis histochemisch untersucht. Das Alter der Patientinnen schwankte zwischen 20 und 56 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von nahezu 40 Jahren (38,7 Jahre). Im einzelnen lagen folgende Operationsindikationen vor, die alle etwa gleich häufig vorkamen:

a) Abdominale Radikaloperation bei Cervix- beziehungsweise Corpuscarcinom
b) Abdominale Totalexstirpation unter Mitnahme einer Adnexe bei Uterus myomatosus
c) Keilexcision bei Stein-Leventhal-Syndrom
d) Excision eines Corpus luteum mentruationis während einer Laparotomie.

Bei dem relativ hohen Alter der Patientinnen fanden sich in den untersuchten Ovarien nur wenige Primär- und Sekundär-

follikel. Auch reifende Tertiärfollikel waren nur ganz selten anzutreffen; zumeist lagen atretische Follikel vor.

Die 16 untersuchten Corpora lutea graviditatis stammten von Patientinnen im Alter zwischen 20 und 43 Jahren (Durchschnittsalter 31,5 Jahre). Die Exstirpation der Gelbkörper wurde bei folgenden Operationsindikationen durchgeführt:

a) Tubargravidität: 7 Fälle, 2.-6.Woche post ovulationem
b) Interruptio: 4 Fälle, 6.-20.Woche post ovulationem
c) Sectio caesarea: 5 Fälle, 38.-40.Woche.

Aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial ergab sich ein Überblick über das histochemische Verhalten der Schwangerschaftsgelbkörper im Verlauf der Gravidität.

B. Vorbereitung des Gewebes

Ein großer Teil der Oxydoreduktasen wird durch die gebräuchlichen Fixationsmittel sehr rasch inaktiviert. Daher ist die Verwendung unfixierter, frischer Gewebsschnitte eine Voraussetzung für die Darstellung dieser Enzyme. In der Kryostat-Methode steht heute ein Verfahren zur Herstellung unfixierter Schnitte zur Verfügung.

In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Anfertigung der Gewebsschnitte auf folgende Weise: Die frischen Operationspräparate wurden möglichst rasch mit Kohlensäureschnee eingefroren und anschließend in einem Kryostaten in einer Dicke von 8-10 µ geschnitten. Die auf einen Objektträger aufgezogenen Gefrierschnitte ließen sich bei einer Temperatur von -18°C für einige Tage ohne Verlust der Enzymaktivität

aufbewahren. Sie wurden dann vor Beginn der Inkubation langsam bei Zimmertemperatur aufgetaut. Da für ein Präparat zumeist nur wenige ml des Inkubationsmediums zur Verfügung standen, mußten die Schnitte vor der Inkubation mit Wachs umrandet werden, um ein Abfließen der Inkubationslösung zu verhindern. Die Inkubation selbst erfolgte für alle Redoxenzyme bei einer Temperatur von 37°C in einem Homoiostaten.

C. Schutz der Mitochondrien

Beim histochemischen Nachweis der Oxydoreduktasen ohne Vorfixierung des Gewebes besteht die Gefahr, daß lösliche Gewebsbestandteile, in erster Linie Enzyme, in das Inkubationsmedium diffundieren. Im Gefolge dieser Vorgänge kommt es zu einer Verquellung und unter Umständen auch zum Platzen der Mitochondrien, was eine Verschlechterung der Farbstofflokalisation zur Folge hat. Diese osmotische Schädigung der Mitochondrien kann durch Zusatz von 7,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) zum Inkubationsmedium weitgehend verhindert werden. Eine leichte Alteration der Mitochondrienmembran hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, da hierdurch die Diffusion der Farbstoffbildner und Coenzyme vom Inkubationsmedium in die Mitochondrien beim histochemischen Nachweis der Dehydrogenasen begünstigt wird.

D. Zur Frage einer cytochemischen Enzymlokalisation

Durch die Verfeinerung der enzymhistochemischen Technik ist es in den letzten Jahren möglich geworden, einen Teil der Oxydoreduktasen, in erster Linie die Dehydrogenasen und die Diaphorasen, nicht nur zellulär, sondern auch intra-

zellulär zu lokalisieren. Die Aussagekraft der cytochemischen Befunde bleibt jedoch meist gering, weil die nachgewiesene Fermentreaktion histochemisch nicht absolut spezifisch dargestellt werden kann.

Es soll in diesem Zusammenhang betont werden, daß bei den vorliegenden Untersuchungen keine cytochemische intrazelluläre Fermentanalyse angestrebt wurde. Die von ZIMMERMANN u. PLATT (1960) als "histologisch optimal" angegebene Inkubationszeit von 5 Minuten für die Dehydrogenasen und Diaphorasen wurde auf 30 Minuten ausgedehnt und dafür eine leichte Überfärbung des Präparats in Kauf genommen. Auch RUDOLPH (1960) hält eine Inkubationszeit von 20-40 Minuten für notwendig, damit alle Zellen exakt demonstriert werden. Die verlängerte Inkubationszeit macht durch die erwähnte Überfärbung der Schnitte eine cytochemische Auswertung unmöglich. Sie hat jedoch den Vorteil, daß die quantitativen Unterschiede in der Enzymaktivität der einzelnen Zellarten deutlicher hervortreten.

4.2 Histochemie der Oxydasen

4.21 Die Cytochromoxydase

4.211 Biochemie

Wirkt eine Lösung von α-Naphthol und NN-Dimethyl-paraphenylendiamin (abgekürzte Bezeichnung: Nadi) unter aeroben Bedingungen auf tierisches Gewebe ein, so bilden sich rasch intrazellulär gelegene Indophenolblaugranula. Diese zuerst 1885 von Paul EHRLICH beschriebene Reaktion wurde der katalytischen Aktivität eines Enzyms zugeschrieben, das Indophenoloxydase genannt wurde. Eingehende Untersuchungen vor allem von KEILIN und HARTREE (1938, 1939) deuteten darauf hin, daß dieses Ferment mit dem Cytochrom a_3 von KEILIN und dem Warburgschen Atmungsferment identisch ist. Die Isolierung und Reindarstellung bereitete jedoch Schwierigkeiten, so daß lange Zeit Struktur und Wirkungsweise nicht sicher geklärt werden konnten. So wurde die heute übliche Bezeichnung Cytochromoxydase mehr aus theoretischen Überlegungen heraus demjenigen Ferment zugeschrieben, das in der Endphase der biologischen Oxydation Elektronen von den Cytochromen auf molekularen Sauerstoff überträgt.

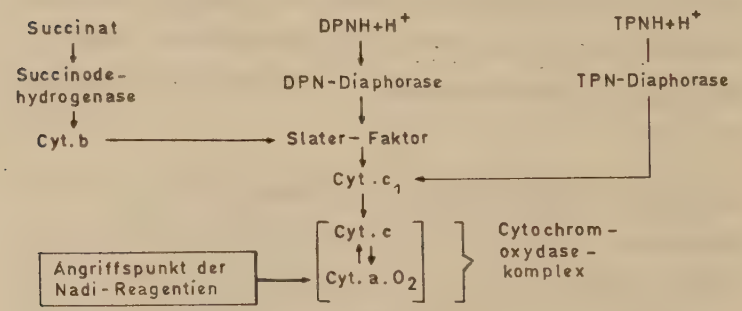
Nach neueren Untersuchungen, die OKUNUKI (1962) an Rinderherzmuskelsuspensionen durchführte, läßt sich die Cytochromoxydaseaktivität jedoch nicht auf die Wirkung eines einzelnen Ferments zurückführen. Die Aktivierung von molekularem Sauerstoff ist nur durch das Zusammenwirken von äquimolaren Mengen der Cytochrome a und c in komplexer

Bindung möglich. Die Existenz des von KEILIN geforderten Cytochroms a_3 konnte von OKUNUKI nicht bestätigt werden. Das Cytochrom a enthält als funktionell wirksame Gruppen Eisen und Kupfer und ist intramitochondral fest an die Zellstruktur gebunden. Das Cytochrom c dagegen ist leicht löslich und kann durch Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem Gewebe entfernt werden.

Als wichtigster natürlicher Elektronendonator für die Cytochromoxydase fungiert in der Zelle das Cytochrom c_1, das den Großteil seiner Elektronen aus den folgenden drei Quellen bezieht:

a) Vom Succinat über das Succinoxydasesystem,
b) von den DPN-gebundenen Dehydrogenasen über die DPN-Diaphorase und
c) in geringerem Umfang auch von den TPN-abhängigen Dehydrogenasen über die TPN-Diaphorase.

Damit läßt sich die heutige Vorstellung über den Aufbau der Atmungskette folgendermaßen wiedergeben:



Übersicht 4: Stellung der Cytochromoxydase in der Atmungskette.
(Modifiziert nach OKUNUKI, 1962).

Wie aus dieser Übersicht hervorgeht, nimmt die Cytochromoxydase als Kopplungsglied zwischen Redoxfermenten und Sauerstoff eine zentrale Stellung im Energiestoffwechsel ein. Das Enzym läßt sich in allen Zellen mit Ausnahme der Erythrocyten und der anaeroben Bakterien nachweisen. Da die Höhe der Cytochromoxydaseaktivität für den Sauerstoffverbrauch und damit auch für den Energieumsatz einer Zelle bestimmend ist, kann sie als Maßstab für die Zellaktivität und zur Beurteilung der "Oxydationskapazität" (PEARSE,1961) eines Organs herangezogen werden.

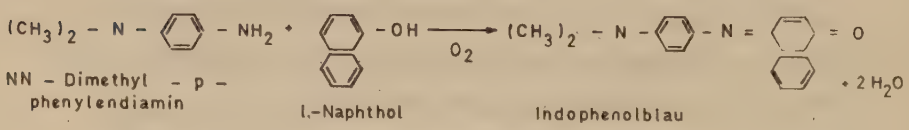
4.212 Histochemie

Im Widerspruch zu der Bedeutung der Cytochromoxydase im Stoffwechsel als Reaktionsvermittler für molekularen Sauerstoff steht die Unzulänglichkeit ihres histochemischen Nachweises. Noch immer erfolgt die Lokalisation des Ferments mit der von GRÄFF (1922) ausgearbeiteten Nadi-Methode. Dieses Verfahren hat später durch MOOG (1943) und PERNER (1952) einige Modifikationen erfahren.

CRAWFORD u.NACHLAS (1958), NACHLAS et al. (1958[a]) und BURSTONE (1961) setzten sich kritisch mit dem Nachweis der Cytochromoxydase auseinander. Durch die Verwendung neuer Elektronendonatoren konnten diese Autoren eine Verbesserung der Ergebnisse erzielen.

Alle genannten Verfahren zur histochemischen Darstellung der Cytochromoxydase beruhen auf demselben Prinzip: Die natürlichen Elektronenüberträger des Ferments werden durch schwache chemische Reduktionsmittel ersetzt, die sich leicht zu

Farbstoffen oxydieren lassen. Bei der Nadi-Reaktion erfolgt unter der Wirkung der Cytochromoxydase eine Verknüpfung von α-Naphthol und N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin. Es entsteht Indophenolblau, das sich in Form tiefblauer Granula im Gewebe niederschlägt. Diese Reaktion läuft nach folgender Gleichung ab:



Als Angriffspunkt für die reduzierende Wirkung der Nadi-Reagentien dient wahrscheinlich das Cytochrom a, das sich durch p-Phenylendiamin direkt und vollständig reduzieren läßt (OKUNUKI, 1962). Die von SLATER (1949) aufgestellte Theorie, daß das Cytochrom c durch die Nadi-Reagentien reduziert wird, ist damit wenig wahrscheinlich geworden. Für den positiven Ausfall der Nadi-Reaktion im Gewebe ist jedoch die Anwesenheit beider Enzyme notwendig, da das Cytochrom a nur in komplexer Bindung mit Cytochrom c mit molekularem Sauerstoff zu reagieren vermag.

Einwände gegen die Verläßlichkeit der Nadi-Methode ergeben sich vor allem aus den mangelhaften Farbstoffqualitäten des Indophenolblaus. Auf zwei Punkte soll in diesem Zusammenhang besonders hingewiesen werden, da sie sich bei der Demonstration der Cytochromoxydase im Ovar nachteilig bemerkbar machen:

a) Das Indophenolblau ist leicht fettlöslich, und kann auch als Fettfarbstoff verwendet werden. Eine Diffusion des Farbstoffs in die lipoidreichen Strukturen des Ovars ist daher unvermeidlich. Aus diesem Grunde dürfen die histochemischen Befunde nur mit Vorbehalt interpretiert werden, auch wenn die Auswertung der Gewebschnitte sofort nach der Inkubation erfolgt.

b) Es war schon GRÄFF (1916) aufgefallen, daß sich das Indophenolblau im Gewebe innerhalb kurzer Zeit wieder entfärbt. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß das Indophenolblau durch die im Gewebe vorhandenen Dehydrogenasen zu Indophenolweiß reduziert wird (CRAWFORD u. NACHLAS, 1958). Durch eine Stabilisierung der Indophenolblaugranula mit Lugolscher Lösung und Lithiumcarbonat (GRÄFF, 1916; LILLIE u. BURTNER, 1953) unmittelbar nach der Inkubation, kann dieser Effekt weitgehend verhindert werden.

4.213 Bisherige Befunde im Ovar

Nach der von SCHULTZE für den Nachweis von Oxydasen angegebenen Methode gelang MORI et al. im Jahre 1929 die Demonstration von Oxydationsgranula im Rattenovar vornehmlich in Corpora lutea, Zwischenzellen und in der Theca reifender Follikel. MEYER et al. (1947) und Mc SHAN et al. (1948) fanden bei biochemischen Untersuchungen eine höhere Konzentration der Cytochromoxydase in Corpora lutea der Ratte während der Gravidität als im Diöstrus, wobei die maximale Enzymwirkung zwischen dem 7. und 15. Tag der Gravidität lag. Im Kaninchenovarium wurde das Ferment in der Granulosa und im

Plasma der Eizelle von Sekundär- und Tertiärfollikeln, in geringerer Aktivität auch in der Theca interna nachgewiesen (ARVY, 1960). KÖNIG (1962) berichtete über eine wesentlich höhere Aktivität der Cytochromoxydase in menschlichen Corpora lutea graviditatis als im Ovarialstroma.

4.214 Methodik

A. Untersuchungsmaterial

Die Cytochromoxydase wurde in 33 Ovarien von nichtschwangeren Patientinnen und in 9 Corpora lutea graviditatis nachgewiesen.

B. Die G-Nadi-Oxydasereaktion

Die grundlegenden Arbeiten über die Nadi-Methode gehen auf GRÄFF zurück (1916, 1922, 1936). Zuvor war die Nadi-Reaktion 1895 von ROHRMANN an Homogenaten, von WINKLER (1907) und SCHULTZE (1909 a,b) an formolfixierten Schnitten angewandt worden. GRÄFF (1922) unterschied dann erstmals zwischen der gegen Formolfixation unempfindlichen M-(=Myelo-) Nadioxydase von WINKLER und SCHULTZE, deren Aktivität auf Granulocyten beschränkt bleibt und einer G-(=Gewebs-) Nadioxydase. Letztere war nur in frischen Gewebsschnitten nachweisbar und durch Formalinbehandlung leicht zu inaktivieren. AGNER (1941) deutete die M-Nadi-Reaktion als Ausdruck einer Peroxydaseaktivität in den Granulocyten. Die G-Nadi-Oxydase erwies sich als identisch mit der Cytochromoxydase; ihr Nachweis mit den Nadi-Reagentien gilt heute als Nadi-Methode im eigentlichen Sinne.

C. Das in dieser Arbeit verwandte, im wesentlichen von GRÄFF (1922) angegebene Inkubationsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

α-Naphthol	0,1 %	2,5 Teile
Dimethyl-p-phenylendiamin	0,12%	2,5 Teile
Phosphatpuffer (pH 8)	0,1 mol	1 Teil

Als besonders wichtig erwies sich die Einstellung eines optimalen pH-Wertes, der nach GRÄFF (1922) für tierisches Gewebe bei pH 8-9, für pflanzliches Gewebe dagegen bei pH 3-6 liegt.

D. Ausführung der Reaktion

Die Gefrierschnitte wurden in offenen Schalen in die frisch bereitete Inkubationslösung eingelegt und nach folgendem Schema weiterbehandelt:

a) Inkubation bei 37° 15 Min.

b) Spülen in physiologischer $CaCl_2$-Lösung

c) Stabilisierung der Indophenolblaugranula:

α) Behandlung mit Lugolscher Lösung (verdünnt mit Wasser im Verhältnis 1:1) 3 Min.

ß) Einstellen in Lithiumcarbonat (0.005%) 30 Min.

d) Eindecken in Glycerin.

4.215 Ergebnisse

Die enzymatische Wirkung der Cytochromoxydase ist ubiquitär in allen Zellen des Ovarialgewebes demonstrierbar. Das Indo-

phenolblau lagert sich zunächst in Form tiefblauer Granula in den Zellen ab, nimmt aber nach der Stabilisierung mit Lithiumcarbonat und Lugolscher Lösung eine braune Farbe an.

Die stärkste Farbstoffbildung findet sich im Zentrum kleinster Gefäße, die als Kapillaren gedeutet wurden. Die Enzymaktivität ist jedoch nicht nur im Lumen, sondern auch in der unmittelbaren Umgebung dieser Gefäße außerordentlich hoch. Es ist anzunehmen, daß diese intensive Reaktion durch eine Anfärbung der Leukocyten zustandekommt. Im Gegensatz zu den Kapillaren zeigen die größeren Gefäße und das Ovarialstroma nur eine geringe Enzymaktivität.

Intakte und atretische Primärfollikel heben sich in ihrer Reaktion nur wenig von dem umgebenden Ovarialbindegewebe ab. Auch in Eizelle und Granulosa der Sekundärfollikel ist nur eine mäßige Farbstoffreaktion nachweisbar. Die Tertiärfollikel besitzen in der Theca interna einen mittleren Cytochromoxydasegehalt, der denjenigen der Granulosa deutlich übertrifft. Dort findet sich eine stärkere Anfärbung nur in den basal gelegenen Zellschichten. Auch in frisch rupturierten Graafschen Follikeln reagiert die Thecaformation zunächst intensiver als die Granulosa, wobei beide Zellstrukturen sehr hohe Farbstoffwerte aufweisen.

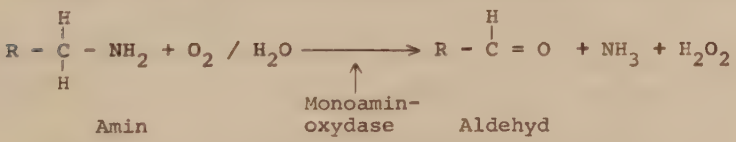
Über die Aktivität und Verteilung der Cytochromoxydase in den Corpora lutea und den von SEITZ als Thecaluteinzellen bezeichneten interstitiellen Zellen sind nur unsichere Angaben möglich, da bereits während der Inkubation eine Diffusion des Indophenolblaus in die Lipoidsubstanzen einsetzt und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Alle Fett-

vakuolen weisen schon kurz nach der Inkubation eine diffus rote Anfärbung auf, die im Laufe der Zeit an Intensität zunimmt. Die Stärke dieser Farbstoffbildung deutet darauf hin, daß auch in den Gelbkörpern eine sehr hohe Aktivität der Cytochromoxydase vorhanden ist, wobei die Thecaluteinzellen einen höheren Färbegrad als die Granulosaluteinzellen aufzuweisen scheinen. Exakte Aussagen lassen sich jedoch bei dem Ausmaß der Farbstoffdiffusion nicht machen.

4.22 Monoaminoxydase

4.221 Biochemie

Die Monoaminoxydase ist ein unlösliches, vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiertes Enzym, das wahrscheinlich der Gruppe der Flavoproteine zuzurechnen ist. Sein Wirkungsbereich erstreckt sich auf aliphatische und aromatische Monoamine, die über eine oxydative Desaminierung nach folgender Gleichung in Aldehydverbindungen umgewandelt werden:



Die Funktion der Monoaminoxydase im tierischen Organismus besteht in erster Linie darin, die biologisch hochaktiven sogenannten biogenen Amine zu inaktivieren und zu entgiften. Aus dieser Gruppe natürlicher Substrate sind besonders zu erwähnen:

a) Das gefäßaktive Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
b) Tyramin und Tryptamin, zwei Stoffe, die als toxische Produkte der bakteriellen Zersetzung von Aminosäuren im Darm entstehen
c) bestimmte Amine, die als Zwischenstufen des Adrenalin- und Noradrenalinstoffwechsels auftreten.

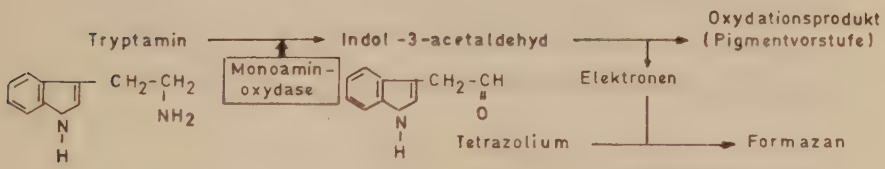
4.222 Histochemie

Für den histochemischen Nachweis der Monoaminoxydase stehen heute mehrere Methoden zur Verfügung. Ihnen allen liegt dasselbe Prinzip, die Sichtbarmachung der durch die Monoaminoxydase gebildeten Aldehydgruppen zugrunde. Zwei ältere Verfahren von OSTER u.SCHLOSSMAN (1942) sowie BLASCHKO u. HELLMANN (1953) konnten sich nicht durchsetzen, da die Spezifität dieser Nachweisreaktionen unzureichend war. KÖLLE u. VALK (1954) kamen dann erstmals zu zufriedenstellenden Resultaten, indem sie Diazo Blue B auf die durch ein Carbonylreagenz gebundenen Aldehydgruppen einwirken ließen.

Heute am gebräuchlichsten ist die auch bei den vorliegenden Untersuchungen verwandte Methode nach GLENNER et al. (1957), bei der das Tetrazoliumsalz Nitro-BT als Indikator für die Enzymwirkung dient (näheres über Tetrazoliumsalze Seite 32 ff). Bei Inkubation von Gewebsschnitten mit Tryptamin und Nitro-BT bilden sich an den Orten der Monoaminoxydaseaktivität blaue Formazangranula. Der Mechanismus dieser Farbstoffbildung war zunächst unklar. Untersuchungen von GLENNER et al. (1960) ergaben, daß die Tetrazoliumreduktion hier im Gegensatz zu den übrigen Nachweisreaktionen für

Dehydrogenasen und Diaphorasen auf nichtenzymatischem Wege erfolgt. Das Formazan entsteht also nicht durch direkten Einfluß der Monoaminoxydase, sondern durch die reduzierende Wirkung einer Substanz, die bei der oxydativen Desaminierung von Indolaminen (Tryptamin, Serotonin) als Reaktionsprodukt gebildet wird. Diese Verbindung, das Indol-3-acetaldehyd, vermag das Nitro-BT rasch und vollständig zu reduzieren und wird hierbei wahrscheinlich zu der Vorstufe eines von BLASCHKO u. HELLMANN (1953) beschriebenen Pigments oxydiert. Die Methode scheint einen genügend hohen Spezifitätsgrad zu besitzen, da außer dem Indolacetaldehyd keine andere Aldehydverbindung eine reduzierende Wirkung auf Nitro-BT ausübt . Zur Kontrolle der Reaktionsspezifität können die Inhibitoren der Monoaminoxydase (Marsilid u.a.) herangezogen werden.

Der ganze Vorgang des Monoaminoxydasenachweises läßt sich nach GLENNER et al. (1960) in folgendem Schema darstellen:



4.223 Bisherige Befunde

Die Monoaminoxydase ist in den letzten Jahren in vielen Organen histochemisch untersucht worden. Über den Nachweis des Enzyms im Kaninchenovar hat ARVY (1960) berichtet. Sie fand eine hohe Enzymaktivität nur in der Kapsel und im

Interstitium des Ovars. Die Follikel reagierten schwach positiv, die Gelbkörper waren negativ.

4.224 Methodik

A. Das Untersuchungsmaterial umfaßte 16 Ovarien nichtschwangerer Patientinnen und 3 Corpora lutea graviditatis.

B. Das von GLENNER et al. (1957) angegebene Inkubationsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Tryptaminhydrochlorid	25 mg
Natriumsulfat	4 mg
Nitro Blue Tetrazolium (Nitro-BT)	5 mg
Phosphat-Puffer (0,1 mol; pH 7,6)	5 ml
Auqa dest.	15 ml

C. Ausführung der Reaktion

a) Inkubation frischer Gefrierschnitte bei 37°C	45 Min.
b) Auswaschen in fließendem Wasser	2 Min.
c) Fixation in 10%igem neutralem Formol	24 Std.
d) Eindecken in Glycerin-Gelee.	

4.225 Ergebnisse

Die Aktivität der Monoaminoxydase ist im Stroma ovarii nur schwach ausgeprägt. Sie scheint in der Markzone geringer zu sein als im Rindenbereich und fehlt in den Gefäßen fast ganz. Die Eizelle zeigt in Primär- und Sekundärfollikeln eine intensivere Farbstoffablagerung als das Follikelepithel. Mit Beginn der Follikelatresie ist in beiden Struk-

turen eine Zunahme der Fermentreaktion nachweisbar. Reife und atretische Tertiärfollikel lassen nur in der Theca interna eine geringe Aktivität der Monoaminoxydase erkennen, die Granulosa reagiert negativ. Eine hohe Enzymaktivität findet sich in jüngeren Corpora lutea menstruationis, in den interstitiellen Zellen und in Schwangerschaftsgelbkörpern. Letztere weisen während der gesamten Dauer der Gravidität eine gleichbleibend intensive Monoaminoxydasereaktion auf. Hiluszellen konnten in einem Fall (28-jährige Patientin, Mens X) gefunden werden. Sie entsprechen in ihrer Reaktion den Luteinzellen der Gelbkörper.

4.3 Histochemie der Dehydrogenasen

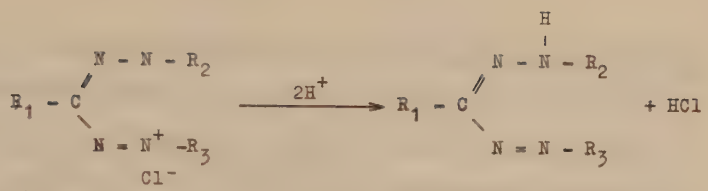
4.31 Allgemeine Methodik

Bei den heute üblichen Verfahren zum histochemischen Nachweis der Dehydrogenasen wird der natürliche Wasserstoffakzeptor der Zelle durch eine leicht reduzierbare Verbindung ersetzt, die sich durch die Aufnahme von Wasserstoff als Farbstoff im Gewebe niederschlägt.

Den umgekehrten Weg beschritt THUNBERG (1920), der über eine Entfärbungsreaktion (Reduktion von Methylenblau) Oxydationsvorgänge im Organismus nachweisen konnte. Diese Methode gab zwar die ersten Hinweise auf die Existenz substratspezifischer Dehydrogenasen, zur histochemischen Demonstration dieser Fermente (SEMENOFF, 1935) erwies sie sich jedoch als wenig geeignet, da Entfärbungsreaktionen im Gewebe nur schwer zu beurteilen sind. Die Dehydrogenasenhistochemie gewann erst an Bedeutung, als mit den Tetrazoliumsalzen leicht reduzierbare Farbstoffbildner zur Verfügung standen.

4.311 Die Tetrazoliumsalze

Im Jahre 1894 gelang PECHMANN u. RUNGE durch die Oxydation von Formazylverbindungen erstmals die Darstellung von Tetrazolen. Es handelt sich bei diesen Substanzen um die Salze quarternärer Ammoniumbasen, die durch Reduktion leicht in Formazanfarbstoffe überführt werden können:



Tetrazoliumsalz Formazan

Durch die Verknüpfung zweier geeigneter Monotetrazole in Stellung R_3 lassen sich Ditetrazoliumverbindungen herstellen, deren Formazane ebenfalls Farbstoffcharakter besitzen.

Aus der großen Zahl älterer Tetrazoliumverbindungen, die vorübergehend in der Enzymhistochemie zur Anwendung kamen, sind besonders zu nennen:

a) Monotetrazole: TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid)
INT (Jodo-nitrotetrazoliumchlorid)

b) Ditetrazole: NT (Neotetrazolium)
BT (Blue Tetrazolium).

Alle diese Substanzen erwiesen sich in ihren Eigenschaften als unzulänglich für histochemische Zwecke. Sie sind inzwischen durch zwei Tetrazoliumsalze abgelöst worden, die in den letzten Jahren in die Histochemie eingeführt wurden:

a) Das von TSOU et al. (1956) entwickelte Ditetrazoliumsalz Nitro-BT = 2,2'-di-p-nitrophenyl-5,5'-di-phenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylen)-ditetrazoliumchlorid und

b) das Monotetrazoliumsalz MTT = 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, dessen histochemische Anwendung von PEARSE (1957) ausgearbeitet wurde.

Die besonderen Vorzüge dieser neuen Tetrazoliumsalze liegen in ihrer außerordentlich leichten Reduzierbarkeit und in der Bildung nichtkristalliner Farbstoffniederschläge. Diese beiden Eigenschaften ermöglichten die Entwicklung von empfindlicheren und exakter auswertbaren Nachweismethoden, die teilweise auch eine cytochemische Demonstration der wasserstoffübertragenden Fermente erlauben. Dennoch haften auch diesen beiden Farbstoffbildnern einige Mängel an, die hier diskutiert werden sollen, weil ihre Nichtbeachtung zu einer falschen Deutung der histochemischen Befunde führen kann.

A) Substantivität des Nitro-BT für Lipoproteine

Das langgestreckte Nitro-BT-Molekül wird in der Zelle sehr rasch an Lipoproteinstrukturen gebunden. Diese Affinität zu Proteinen, die auch als Substantivität bezeichnet wird, verhindert die Auskristallisation des Formazans und ist daher für den feingranulären Farbstoffniederschlag des Nitro-BT verantwortlich. Die Adsorption an Zellkomponenten ist jedoch nicht unbedingt als Vorteil anzusehen. PEARSE u. HESS (1961) konnten nämlich zeigen, daß das Nitro-BT eine besonders ausgeprägte Substantivität für ungesättigte Lipoide besitzt. Solche Substanzen finden sich in reichem Maße im Corpus luteum während dessen Blütestadium (PFLEIDERER u. DIEZEL, 1959) und wahrscheinlich ebenso in der Theca interna reifender Follikel. Daher kann zumindest der cytochemische Nachweis der Dehydrogenasen in diesen Geweben leicht ein falsches Bild vom Ort der Enzymaktivität geben. Sieht man jedoch von einer intrazellulären Enzymlokalisation ab, so

stellt die Substantivität des Nitro-BT keinen entscheidenden Nachteil dar.

B) Cobalt-Chelatbildung des MTT

Da das MTT keinerlei Substantivität besitzt, kristallisiert es sehr leicht im Gewebe aus. Von PEARSE (1957) konnte jedoch ein Verfahren entwickelt werden, das diesen Vorgang verhindert. Hierbei wird das MTT-Formazan durch eine Chelatbildung mit Cobaltionen am Entstehungsort gebunden und fällt als nichtkristalliner, tiefschwarzer Farbstoff aus. Die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode bleibt auf diejenigen Dehydrogenasen beschränkt, bei deren Nachweis die Anwesenheit von Cyanid im Inkubationsmedium nicht erforderlich ist (siehe hierzu S. 38f und S. 63).

C) Fettlöslichkeit des MTT

Nachteilig wirkt sich beim Dehydrogenasennachweis im Ovar die Fettlöslichkeit des MTT aus. Zwar läßt sich das mit violetter Farbe in den Fettvakuolen gelöste Formazan leicht von den tiefschwarzen Granula im Gewebe unterscheiden. Der Einfluß, den die Fettlöslichkeit des MTT-Tetrazoliumsalzes auf die Dehydrogenasenreaktion ausübt, ist jedoch nicht genau abschätzbar.

D) Verunreinigung des Nitro-BT mit Monotetrazolen

Bei der Reduktion des Nitro-BT und der anderen Ditetrazole entstehen im Gewebe zwei verschiedene Reaktionsprodukte. Außer dem tiefblauen, granulär abgelagerten Diformazan läßt sich immer auch ein nichtgranulärer roter Farbstoff nachweisen. Anfänglich wurde die rote Komponente als eine halb-

reduzierte Form der Ditetrazoliummoleküle angesehen. Die Versuche von BURTNER et al. (1956) und NACHLAS et al. (1958b) deuten jedoch darauf hin, daß das rote Formazan durch die Reduktion von Monotetrazolen gebildet wird, die als Verunreinigung allen Ditetrazolen beigemengt sind. Durch die Überlagerung der beiden Reaktionsprodukte im Gewebe ergibt sich eine erhebliche Unsicherheit bei der Beurteilung der Nitro-BT-Reaktion. Grundsätzlich wurden bei der Auswertung der Befunde nur die blauen Diformazanablagerungen berücksichtigt.

4.312 Allgemeine Probleme der Dehydrogenasenhistochemie

Die im Gewebe vorhandenen Substratkonzentrationen reichen zur Reduktion der Tetrazoliumsalze durch die Dehydrogenasen nicht aus. Durch Zugabe geeigneter enzymspezifischer Substrate zum Inkubationsmedium ist es daher möglich, die Aktivität bestimmter Dehydrogenasen isoliert nachzuweisen. Mit diesem Verfahren läßt sich heute ein breites Spektrum wasserstoffübertragender Fermente histochemisch erfassen (Übersicht 5). Ehe im einzelnen auf die Methodik eingegangen wird, sind einige allgemeine Gesichtspunkte zu erwähnen, die beim histochemischen Dehydrogenasennachweis von Bedeutung sind.

A) Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichts

Die meisten der durch Dehydrogenasen katalysierten Reaktionen sind reversibel, so daß es zu einem Gleichgewicht zwischen den am Redoxvorgang beteiligten Verbindungen kommt:

Enzym	Co-enzym	Stellung des Enzyms im Stoffwechsel	Methodik
β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase	DPN	Fettsäurecyclus	HESS et al.(1958)
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	TPN	Pentosephosphat-cyclus	HESS et al.(1958)
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	TPN	Pentosephosphat-cyclus	HESS et al.(1958)
Isocitronensäure-Dehydrogenase	DPN, TPN	Citronensäure-cyclus	HESS et al.(1958)
Äpfelsäure-Dehydrogenase	DPN	Citronensäure-cyclus	HESS et al.(1958)
Glutaminsäure-Dehydrogenase	DPN	oxydative Desaminierung	HESS et al.(1958)
α -Glycerophosphat-Dehydrogenase	DPN	Glycolyse	HESS et al.(1958)
Alkohol-Dehydrogenase	DPN	Glycolyse	HESS et al.(1958)
Milchsäure-Dehydrogenase	DPN	Glycolyse	HESS et al.(1958)
Bernsteinsäure-Dehydrogenase	FAD	Citronensäure-cyclus	NACHLAS et al. (1957)
DPN-Diaphorase	FAD	Atmungskette	SCARPELLI et al. (1958)
TPN-Diaphorase	FAD	Atmungskette	SCARPELLI et al. (1958)
3β-ol-Steroid-Dehydrogenase	DPN	Steroidsynthese	WATTENBERG (1958), LEVY et al.(1959a)
17β-ol-Steroid-Dehydrogenase	DPN, TPN	Steroidsynthese	PEARSON u. GROSE (1959)
Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase	DPN	Glycolyse	HIMMELHOCH u. KARNOVSKY (1961)

Übersicht 5: Die histochemisch erfaßbaren Dehydrogenasen und Diaphorasen und ihre Stellung im Stoffwechsel der Zelle.

Substrat+oxydiertes Coenzym $\rightleftharpoons$ oxydiertes Substrat+reduziertes Coenzym

Dieses Reaktionsgleichgewicht kann beim histochemischen Enzymnachweis auf verschiedene Arten beeinflußt werden.

Da mit zunehmender Inkubationszeit die Gefahr einer Verfälschung der histochemischen Ergebnisse zunimmt, ist ein möglichst rascher Ablauf der Substratoxydation anzustreben. Hierzu ist die Zusammensetzung des Inkubationsmediums so zu wählen, daß das Reaktionsgleichgewicht möglichst weit zum Oxydationsprodukt hin verschoben wird. Neben einer ausreichend hohen Substratkonzentration und günstigen pH-Verhältnissen erwies sich die Beseitigung des Reaktionsproduktes als besonders wirksam (HESS et al., 1958). Bewährt hat sich die Anwendung von Cyanid, das die bei den Dehydrierungsvorgängen gebildeten Carbonylverbindungen inaktiviert.

B) Zusatz von Coenzymen zum Inkubationsmedium

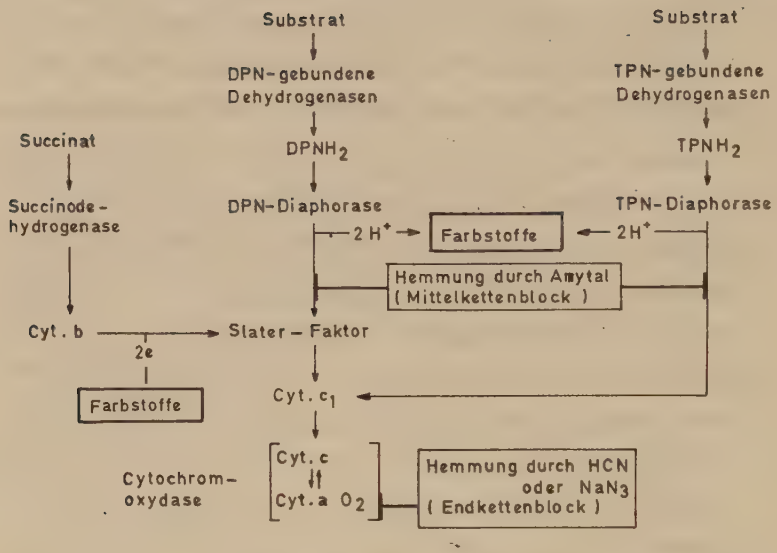
Da die Pyridinnucleotide nur in lockerer Bindung zu ihren Apofermenten stehen, geht während der Inkubation ein großer Teil durch Diffusion ins Inkubationsmedium verloren. Zudem erfolgt im Gewebe eine rasche Zerstörung durch Nucleotidasen. Der Zusatz von Coenzymen in ausreichender Konzentration zum Inkubationsmedium ist daher unbedingt erforderlich, um den Ablauf einer Dehydrogenasenreaktion überhaupt zu ermöglichen. Je nach der Coenzymspezifität des untersuchten Enzyms ist dabei DPN oder TPN anzuwenden.

C) Blockierung des natürlichen Elektronenwegs

Die Formazanbildung beim Dehydrogenasennachweis kann dadurch erhöht werden, daß der Elektronenweg über die Atmungskette zum Sauerstoff blockiert wird. Die Folge ist eine Durchreduzierung der Atmungskette mit einem Aufstau von Elektronen, die nun vermehrt über den alternativen Weg zu den Tetrazoliumsalzen abfließen. Die Blockierung der Atmungskette kann entweder durch die Hemmung der Cytochrome mit Hilfe von Cyanid oder Natriumacid erfolgen (Endkettenblock), oder aber durch Amytal, das unmittelbar nach den Diaphorasen in die Atmungskette eingreift (Mittelkettenblock) (Übersicht 6). Wahrscheinlich können hiermit jedoch nicht alle natürlichen Elektronenwege ausgeschaltet werden (PEARSE, 1961), so daß ein Teil der Elektronen für den histochemischen Nachweis verloren geht.

D) Enzymspezifität der Dehydrogenasenreaktion

Die Interpretation der Dehydrogenasenreaktion wird durch den Umstand erschwert, daß sich die Tetrazoliumsalze durch die Dehydrogenasen nicht direkt reduzieren lassen. Immer sind an der Formazanbildung auch Fermente der Atmungskette beteiligt. Im Falle der pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen wird der Wasserstoff durch die Diaphorasen auf die Tetrazole übertragen. In dem an FAD gebundenen Succinoxydasesystem ist der Ort der Tetrazoliumreduktion von der Art des verwendeten Farbstoffbildners abhängig. NACHLAS et al. (1960) konnten zeigen, daß die älteren Tetrazoliumsalze (BT, NT) die durch die Succinodehydrogenase abgespaltenen Elektronen von der Cytochromoxydase übernehmen. Nitro-BT und MTT werden infolge ihrer hohen Oxydationskraft schon früher in der Atmungskette reduziert.



Übersicht 6: Elektronentransport in der Atmungskette. (Modifiziert nach PEARSE, 1961).

Die Tatsache, daß zumindest die Diaphorasen an der Formazanbildung beteiligt sind, hat zu der grundlegenden Frage geführt, ob ein spezifischer Nachweis einzelner Dehydrogenasen überhaupt möglich ist. Es lag die Vermutung nahe, daß der Formazanniederschlag ein für alle Dehydrogenasen einheitliches Bild bietet, das nicht für die Dehydrogenasen, sondern für die Diaphorasen charakteristisch ist. Tatsächlich fanden FARBER et al. (1956) bei Untersuchungen mit NT und BT nur für das "Succinodehydrogenasesystem" und für die beiden Diaphorasen ein spezifisches Verteilungsmuster im Gewebe, obwohl 6 verschiedene Substrate verwandt wurden. Demgegenüber scheinen jedoch die

neuen Tetrazoliumsalze Nitro-BT und MTT nach Meinung der meisten Autoren eine histochemische Differenzierung der Dehydrogenasen zuzulassen. CASCARANO und ZWEIFACH (1959) befaßten sich eingehend mit diesem Problem. Sie halten eine einwandfreie Darstellung der einzelnen Dehydrogenasen für möglich, allerdings unter der Voraussetzung, daß die nachgewiesenen Enzyme nur in Zellen vorkommen, die auch Diaphorasen enthalten. Außerdem sollte die Aktivität der demonstrierten Dehydrogenasen unter derjenigen der Diaphorasen liegen. Grundsätzlich darf also die Diaphorase beim Nachweis von Dehydrogenasen nicht als limitierender Faktor im Gewebe auftreten. Auf dieser Hypothese basieren alle Methoden der Dehydrogenasenhistochemie.

E) Unspezifische Reduktion der Tetrazoliumsalze

In älteren Arbeiten (Zusammenstellung bei DEANE et al., 1960) wird immer wieder auf eine Formazanbildung im Gewebe bei fehlendem exogenem Substrat hingewiesen. Man führte diese Reaktion auf das im Gewebe vorhandene endogene Substrat zurück, das von bestimmten Dehydrogenasen umgesetzt wird und bezeichnete diese Fermente als "endogene Dehydrogenasen". Nach neueren Untersuchungen von ZIMMERMANN u. PEARSE (1959) erklärt sich dieses Phänomen jedoch aus einer Reduzierung der Pyridinnucleotide durch SH-Gruppen, die bei pH 7 beginnt und nach einem Maximum bei pH 9 rasch wieder zurückgeht. Zur Vermeidung dieses in der angelsächsischen Literatur als "nothing dehydrogenase" bezeichneten Effekts ist für alle pyridinnucleotidabhängigen Dehydrogenasen im Inkubationsmedium ein pH-Wert um 7 anzustreben. Problematisch

ist der Nachweis derjenigen Dehydrogenasen, deren Wirkungsoptimum im alkalischen Bereich liegt, wie das etwa für die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase zutrifft. Die Folge ist eine nicht unerhebliche unspezifische Färbung in Kontrollschnitten, die ohne exogenes Substrat inkubiert wurden.

Als Ursache für eine unspezifische Tetrazoliumreduktion ist im Ovar neben den SH-Gruppen besonders an die reduzierende Wirkung der ungesättigten Phospholipoide im Corpus luteum zu denken. Sie spielen jedoch bei pH-Werten um 7 eine untergeordnete Rolle bei der Formazanbildung, was durch Kontrollschnitte belegt werden konnte.

Zur Beurteilung der Spezifität einer Dehydrogenasereaktion sollte nach ZIMMERMANN u. PEARSE (1959) folgendes Kriterium herangezogen werden: Eine starke Färbung nach Substratgabe darf nur dann der Wirkung einer spezifischen Dehydrogenase zugeschrieben werden, wenn gleichzeitig negative oder nur schwach positive Kontrollschnitte vorliegen.

4.32 Succino-Dehydrogenase (Bernsteinsäure-Dehydrogenase)

4.321 Biochemie

Die Succino-Dehydrogenase katalysiert in der Reaktionskette des Citronensäurecyclus die reversible Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure nach folgender Gleichung:

$$COOH - CH_2 - CH_2 - COOH \rightleftharpoons COOH - CH = CH - COOH.$$

Das Ferment findet sich fast ausschließlich in den Mitochondrien und läßt sich nur schwer von den zellulären Strukturen abtrennen. Zusammen mit Cytochrom b und anderen Cytochromen bildet es in den Mitochondrienmembranen einen großen Molekülkomplex, der als Succinoxydasesystem bezeichnet wird. Durch die enge Bindung an Cytochrom b kann die Succino-Dehydrogenase die Substratelektronen ohne Zwischenschaltung zusätzlicher Überträgersysteme direkt an die Cytochrome abgeben. Sie stellt damit ein wichtiges Bindeglied zwischen Citronensäurecyclus und Atmungskette dar.

Im Unterschied zu den meisten anderen substratspezifischen Dehydrogenasen wird die prosthetische Gruppe der Succino-Dehydrogenase durch FAD und nicht durch ein Pyridinnucleotid gebildet. Da FAD bei physiologischem pH-Wert nicht dissoziabel an das Apoferment gebunden ist, ist die exogene Zufuhr dieses Coferments beim histochemischen Nachweis nicht erforderlich.

4.322 Histochemie

In einer größeren Zahl von Arbeiten wurde über den histochemischen Nachweis der Succino-Dehydrogenase im Ovar mit Hilfe der Tetrazoliumsalze BT und NT berichtet (Übersicht 7). Die Reduktion dieser beiden Farbstoffbildner im Succinoxydasesystem erfolgt durch die Cytochromoxydase, also unter Einbeziehung des gesamten Enzymkomplexes der Atmungskette (NACHLAS et al., 1960). Die Formazanablagerung im Gewebe erlaubt also in diesem Fall nur eine Aussage über die Gesamtaktivität des Succinoxydasesystems. NOVIKOFF (1959)

Autor	Erscheinungs-jahr d.Arbeit	Untersuchungs-material	angewandte Farb-stoffmethode
MEYER et al.	1945	Ratte	biochem.Unter-suchungen
MEYER et al.	1947	Ratte	biochem.Unter-suchungen
MEYER u. Mc SHAN	1950	Ratte	biochem.Unter-suchungen
SELIGMAN u. RUTENBURG	1951	Ratte, Maus	BT
PADYKULA	1952	Ratte	BT, NT
FORAKER u. DENHAM	1952	Kaninchen	NT
FORAKER et al.	1953a	menschliche Ovarien	NT
FORAKER et al.	1953b	bestrahlte Ka-ninchenovarien	NT
FORAKER et al.	1953c	Kaninchen	NT
RUTENBURG et al.	1953	Säugetier-ovarien	BT
FORAKER et al.	1955	Kaninchen	NT
MALONE	1957	Ratte	NT
NACHLAS et al.	1957	Hund	Nitro-BT
BERNSTORF	1959	transplantierte Mäuseovarien	Methode nach ROSA u. VELARDO (1954)
ARVY	1960	Kaninchen	Methode nach FARBER u.LOUVIERE (1956) mit BT, NT
IKONEN et al.	1961	menschliche Ovarien	Nitro-BT
FORAKER u. CRESPO	1961	menschliche Ovarien	Nitro-BT
KÖNIG	1962	menschliche Ovarien	Nitro-BT

Übersicht 7: Literatur über den Nachweis der Succino-Dehydrogenase im Ovar.

hat vorgeschlagen, die biochemische Charakterisierung des dargestellten Enzyms durch die allgemeine Bezeichnung Succinat-Tetrazolium - Reduktase zu umgehen.

Eine Verbesserung der Methodik beim Nachweis der Succino-Dehydrogenase wurde durch die Verwendung von Nitro-BT als Farbstoffbildner erreicht. Dieses Tetrazoliumsalz wird im Succinoxydasesystem bereits unmittelbar nach dem Cytochrom b reduziert (NACHLAS et al., 1960). Durch die geringere Anzahl zwischengeschalteter Atmungskettenenzyme kommt dem Nitro-BT-Verfahren wahrscheinlich eine höhere Spezifität zu als den älteren Färbemethoden mit BT und NT. Der unterschiedliche Reaktionsmechanismus bei der Farbstoffbildung kann unter Umständen zu differierenden Ergebnissen führen. Daher ist beim Vergleich von Befunden, denen verschiedenartige Tetrazoliumreaktionen zugrundeliegen, Zurückhaltung geboten.

4.323 Bisherige Befunde im Ovar

Die Succino-Dehydrogenase war für längere Zeit die einzige histochemisch demonstrierbare Transhydrogenase. Ihr Vorkommen ist in den meisten Geweben eingehend studiert worden. Wie aus Übersicht 7 hervorgeht, liegt auch über die Verteilung dieses Enzyms im Ovar eine größere Zahl von Untersuchungen vor.

Mit biochemischen Nachweisverfahren bestimmten MEYER et al. (1947) in Corpora lutea trächtiger Ratten eine Aktivitätskurve der Succino-Dehydrogenase, die der Progesteronproduktion in den Gelbkörper nahezu parallel lief. Die

Aktivität des Ferments war während der Gravidität maximal auf das Sieben- bis Achtfache gesteigert, bei einer gleichzeitigen Gewichtszunahme der Corpora lutea um das Dreifache. Im Stroma zeigte sich im Verlauf der Gravidität keine wesentliche Änderung der Fermentaktivität. Die Befunde deuten auf eine Korrelation zwischen dem Aktivitätsgrad der Succino-Dehydrogenase und dem Funktionszustand des Ovarialgewebes hin. FORAKER u. CRESPO (1961) sowie IKONEN et al. (1961) kamen auf Grund histochemischer Untersuchungen mit Nitro-BT zu ähnlichen Ergebnissen. Übereinstimmend fanden beide die höchste Enzymaktivität in Granulosa- und Thecaluteinzellen der Corpora lutea sowie in der Theca interna reifender Follikel. Auch die Gefäßwände zeigten eine relativ starke Formazanablagerung. IKONEN et al. konnten jedoch im Gegensatz zu FORAKER u. CRESPO keine Reaktion in der Granulosazellschicht der Tertiärfollikel nachweisen. KÖNIG (1962) beschrieb eine hohe Aktivität der Succinodehydrogenase in Corpora lutea graviditatis bei jungen Intra- und Extrauterinschwangerschaften.

Mit den obengenannten Ergebnissen stimmen die Befunde derjenigen Autoren, die NT als Indikator verwandten, im wesentlichen überein. Die Anwendung von BT beim Nachweis der Succino-Dehydrogenase brachte jedoch infolge der unzulänglichen Farbstoffeigenschaften unbefriedigende (RUTENBURG et al., 1953) oder negative Ergebnisse (SELIGMAN u. RUTENBURG, 1951).

4.324 Methodik

A. Untersuchungsmaterial:

Untersucht wurden 30 Ovarien und 8 Corpora lutea graviditatis nach der Methode von NACHLAS et al. (1957). Geringe Modifikationen wurden von PEARSE (1961) angegeben.

B. Zur Herstellung des Inkubationsmediums wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, die mehrere Monate im Kühlschrank haltbar ist und sich zusammensetzte aus:

0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,6)	1 Teil
0,2 M Na-Succinat	1 Teil

Die Inkubationslösung enthielt:

Stammlösung	10 ml
wässrige Nitro-BT-Lösung (1 mg/ml)	10 ml

C. Ausführung der Färbereaktion:

a) Inkubation frischer Gefrierschnitte bei 37° an der Luft	20 Min.
b) Auswaschen in physiologischer Kochsalzlösung	1 Min.
c) Fixation in 10prozentigem Formol-Calcium	10 Min.
d) Spülen in 15prozentigem Alkohol	5 Min.
e) Eindecken in Glycerin-Gelee.	

4.325 Ergebnisse

Beim histochemischen Nachweis der Succino-Dehydrogenase entsteht im Gewebe ein besonders fein granulierter Farbstoffniederschlag. Dieser Effekt steht unter Umständen mit der intramitochondralen Lokalisation des Ferments in

Zusammenhang. Es ist anzunehmen, daß die Farbstoffgranula den Sitz der Mitochondrien in der Zelle wiedergeben.

Die Succinodehydrogenase kommt im Ovar ubiquitär in allen Zellen vor, doch bestehen in den verschiedenen Gewebsstrukturen wesentliche Aktivitätsunterschiede. Das Stroma ovarii zeigt eine gleichmäßige, geringe Reaktion der Bindegewebszellen, die im Oberflächenepithel, in der Tunica albuginea und in der Rinde etwas stärker ist als im Markbereich. Die Gefäße weisen eine mittlere Aktivität auf, die sich hauptsächlich in der Media mittlerer und kleiner Arterien lokalisieren läßt.

Das Plasma der Eizelle von intakten Primär- und Sekundärfollikeln entwickelt eine starke Farbstoffreaktion, das Kerngebiet erscheint ausgespart. In den Granulosazellen finden sich die Formazangranula in einer Zone entlang der Zellwand angeordnet; auch hier bleibt das Zellzentrum farbstoffarm. Diese Verteilung der Granula kommt besonders deutlich in den Thecaluteinzellen zum Ausdruck.

Der hohe Formazangehalt der Primär- und Sekundärfollikel läßt sich zunächst auch noch im Stadium der Atresie demonstrieren. Eizelle und Granulosa können in dieser Phase meist nicht mehr sicher unterschieden werden, doch scheinen vorwiegend die Reste der Eizelle zu reagieren. Mit zunehmendem Zerfall des Follikels schwindet allmählich auch der Gehalt an Succinodehydrogenase. Atretische Tertiärfollikel zeigen außerhalb der Glashaut in der Theca interna mittlere Enzymwerte, während die Granulosareste im Cavum folliculi negativ sind.

Die höchste Fermentaktivität ist in den Zellen der Corpora lutea und in den interstitiellen Zellen nachweisbar. Frisch rupturierte Tertiärfollikel sind in der Theca interna deutlich stärker positiv als in der Granulosa. Auch in voll entwickelten Corpora lutea menstruationis und graviditatis besteht in den Thecaluteinzellen eine ausgeprägtere Farbstoffreaktion als in den Granulosaluteinzellen. Die größte Aktivität der Succino-Dehydrogenase im Ovar überhaupt findet sich in den Thecaluteinzellen von Schwangerschaftsgelbkörpern in den ersten 3 - 4 Monaten (Abbildung 1). Während die Formazanniederschläge in den ersten Graviditätsmonaten feinkörnig und gleichmäßig dicht in den Luteinzellen verteilt sind, wird die Färbung gegen Ende der Schwangerschaft grob und unregelmäßig. Im Corpus luteum wechseln zu diesem Zeitpunkt Bezirke mit relativ hoher Aktivität mit Zellgruppen, die nur noch wenig Farbstoff enthalten. Alte Corpora lutea (Corpora fibrosa) zeigen, in der Randzone verstreut, vereinzelte Zellen, die rötliche Fettvakuolen und bräunlichrote Pigmentansammlungen enthalten (Abbildung 2).

4.33 Diaphorasen (Cytochromreduktasen)

4.331 Biochemie

Bei den Cytochromoxydasen handelt es sich um Redoxfermente mit Ferroflavoproteidstruktur, die in der Atmungskette Elektronen von den pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen auf das Cytochromsystem übertragen (Übersicht 2). Es besteht

eine strenge Substratspezifität für eines der beiden reduzierten Pyridinnucleotide, so daß zwischen einer DPNH- und einer TPNH-Cytochromreduktase unterschieden werden kann. Die Existenz zweier verschiedenartiger Cytochromreduktasen wird allerdings von ERNSTER (1958) bestritten.

Als Diaphorasen werden Enzyme bezeichnet, die zwar in Bezug auf Molekulargewicht und Flavingehalt mit den Cytochromreduktasen übereinstimmen (MAHLER, 1956), jedoch nur Farbstoffe vom Typ des Methylenblaus oder der Tetrazoliumsalze, nicht aber das Cytochromsystem zu reduzieren vermögen. Die Ursache für die veränderten Enzymeigenschaften liegt nach MAHLER (1954, 1956) in einem bei der biochemischen Darstellung der Diaphorasen auftretenden Eisenverlust. Nach dieser Anschauung ist die Diaphorase ein Bestandteil des Cytochromreduktasemoleküls, das durch chemische Behandlung die Fähigkeit verloren hat, mit den Cytochromen zu reagieren. Diese Auffassung wurde durch MASSEY (1958) wieder in Frage gestellt, der die Diaphorasen für eigenständige Enzyme hält. Eine endgültige Klärung steht noch aus.

Die Cytochromreduktasen scheinen zum überwiegenden Teil an die Feinstrukturen der Zelle gebunden zu sein. HOOGEBOOM und SCHNEIDER (1950) fanden 49 Prozent der TPNH-Cytochromreduktase der Mäuseleber in den Mitochondrien, während 36 Prozent in submikroskopischen Partikeln lokalisiert waren.

4.332 Histochemie

Methoden zum histochemischen Nachweis der Diaphorasen wurden erstmals von FARBER et al. (1956) und NACHLAS et al. (1958 b,c) entwickelt. Die reduzierten Pyridinnucleotide standen damals als Substrate für die Diaphorasen noch nicht zur Verfügung und mußten daher im Inkubationsmedium durch bestimmte Dehydrogenasen aus der oxydierten Form erst gebildet werden. Mit diesem Verfahren war keine sichere Aussage über die Höhe der Diaphorasenaktivität im Gewebe möglich.

Die Einführung reduzierter Pyridinnucleotide in die Diaphorasenhistochemie durch SCARPELLI et al. (1958) brachte in Verbindung mit den guten Farbstoffeigenschaften von MTT zufriedenstellende Resultate.

4.333 Bisherige Befunde im Ovar

MERKLIN (1958) lokalisierte mit der Technik nach FARBER et al. (1956) beide Diaphorasen in Corpora lutea und Follikeln gravider Mäuse. Die DPNH-Diaphorase wurde von FUHRMANN (1963) in Kaninchen- und Rattenovarien, von FORAKER u. CRESPO (1961) sowie IKONEN et al. (1961) in menschlichen Ovarien nachgewiesen.

FORAKER und CRESPO verwandten die Methode nach FARBER. Die Farbstoffreaktion war im ganzen gesehen relativ schwach. Auf eine starke Formazanbildung im Bindegewebe zwischen den Läppchen der Corpora albicantia wurde hingewiesen.

IKONEN et al. beobachteten die höchste Aktivität der DPNH-Diaphorase in Corpora lutea und in der Theca interna von reifenden und atretischen Tertiärfollikeln; die Granulosa war dagegen fast negativ. In jungen Corpora lutea erschienen die Granulosaluteinzellen anfänglich deutlich schwächer gefärbt als die Thecaluteinzellen. Die Primärfollikel reagierten stark positiv. Es fand sich ein Ring von Formazanablagerungen um die völlig negative Eizelle. Die Enzymaktivität der Corpora albicantia variierte in den einzelnen Zellen.

Die Ergebnisse, die FUHRMANN bei Untersuchungen an Kaninchen- und Rattenovarien erhielt, unterscheiden sich in einigen Punkten von den eben geschilderten Befunden. So fand FUHRMANN eine außergewöhnlich starke Reaktion in den Primärfollikeln. Theca interna und Granulosa von Tertiärfollikeln zeigten gleich starke Formazanablagerungen. Außer den Primärfollikeln reagierten Corpora lutea und das Oberflächenepithel der Ovarien besonders intensiv. Eine 4-tägige Behandlung infantiler Versuchstiere mit Gonadotropinen brachte keine Verstärkung der DPNH-Diaphoraseaktivität.

4.334 Methodik

A. Versuchsmaterial

In 17 Ovarien und 7 Corpora lutea graviditatis wurden die DPNH- und die TPNH-Diaphorase nach der von SCARPELLI et al. (1958) angegebenen Methode lokalisiert.

B. Inkubationsmedium

Es wird zunächst eine Stammlösung hergestellt, die bei 0-4°C 3 bis 4 Wochen lang haltbar ist:

MTT (1 mg/ml)	2,5 ml
Cobalt-chlorid (0,5 M)	0,3 ml
Phosphatpuffer (0,06 M; pH 8,2)	2,5 ml
Aqua dest.	4,1 ml
Polyvinyl-pyrrolidon	75 mg.

Beim Zusammentreffen von Phosphatpuffer und Cobaltchlorid tritt ein Niederschlag auf, der vor der Zugabe der übrigen Lösungen abfiltriert werden muß. Da Cobaltchlorid den pH-Wert des Inkubationsmediums sehr stark senkt, ist eine pH-Einstellung auf einen Wert von 7,2 durch Tris-Puffer (0,2 M; pH 10,4) notwendig.

Das Inkubationsmedium enthält in 1 ml Stammlösung 6 mg DPNH oder TPNH und 2,26 mg Amytal. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit Tris-Puffer (0,2 M; pH 8,5) nochmals auf 7,2 eingestellt.

C. Ausführung der Reaktion

1. Frische Gefrierschnitte werden mit jeweils 0,1 bis 0,2 ml Inkubationslösung überschichtet.
2. Inkubation bei 37°C an der Luft 30 Min.
3. Spülen in 1 % HCl.
4. Fixation in 10%igem Formol-Calcium 15 Min.
5. Spülen in Aqua dest.
6. Eindecken in Glyceringelee.

Eine rasch einsetzende Auskristallisation des MTT in Form großer Nadeln ("escape"; PEARSE, 1957) kann durch Zusatz geringer Mengen von Cobaltacetat (0,5 M) zum Inkubationsmedium verhindert werden (PEARSE, 1957). Eine feingranuläre Verteilung des Formazans läßt sich hiermit über Monate erhalten.

4.335 Ergebnisse

Beim Vergleich der beiden Diaphorasen lassen sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation feststellen. Die TPNH-Diaphorase zeigt einheitlich in allen Geweben eine etwas schwächere Farbstoffreaktion als die DPN-Diaphorase. Beide Fermente scheinen in allen Zellen des Ovars vorhanden zu sein. Eine Reihe von Gewebsstrukturen weist eine so intensive Farbstoffreaktion auf, daß die einzelnen Formazangranula infolge dichter Lagerung nicht mehr unterschieden werden können. Diese maximale Aktivität findet sich

a) in der Theca interna atretischer Tertiärfollikel (Abb.3),
b) in den Thecaluteinzellen von Corpora lutea menstruationis et graviditatis,
c) in der Eizelle atretischer Primär- und Sekundärfollikel,
d) in der von KOHN (1930) als Corpus atreticum thecale bezeichneten Zellformation, die eine während der Schwangerschaft zuweilen auftretende Hyperplasie der Theca interna atretischer Tertiärfollikel darstellt,
e) in einzelnen Zellgruppen, die in der Randzone von Corpora lutea im Stadium der Rückbildung und in Corpora

fibrosa albicantia oft noch über längere Zeit nachweisbar sind. Die Natur dieser Zellen ließ sich nicht sicher feststellen; eine Identität mit den sogenannten Fluorocyten (HAMPERL, 1950) ist wahrscheinlich.

Eine etwas geringere Enzymaktivität als in den eben genannten Geweben findet sich in den Granulosaluteinzellen der Gelbkörper und in intakten Primär- und Sekundärfollikeln. Die Reaktion in der Eizelle ist überwiegend im Zellplasma nachweisbar, der Zellkern bleibt ausgespart. Die Granulosazellschicht der Primär- und Sekundärfollikel zeigt nur eine mäßige Formazanbildung (Abbildung 4). In den Gefäßen sowie in der Granulosa und Theca interna reifender Follikel findet sich eine Reaktion von mittlerer Stärke. Die gleichförmige, schwache Aktivität im Stroma ovarii ist im Oberflächenepithel und in der Rindenzone etwas mehr betont als im Markbereich.

4.34 Pyridinnucleotidgebundene Dehydrogenasen

HESS et al. gelang im Jahre 1958 erstmals die Differenzierung pyridinnucleotidgebundener Dehydrogenasen mit histochemischen Mitteln. Als Farbstoffbildner dienten die Tetrazoliumsalze MTT und Nitro-BT. Die Methodik erlaubt den Nachweis der Glutaminsäure-, α-Glycerophosphat-, Milchsäure-, Isocitronensäure-, Glucose-6-phosphat-, 6-Phosphogluconat-, Alkohol-, Äpfelsäure- und β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase. FARBER et al. (1956) hatten mit Neotetrazoliumchlorid (NT) infolge der mangelhaften Farbstoffeigenschaften dieses Tetrazoliumsalzes keine isolierte Darstellung einzelner

pyridinnucleotidgebundener Dehydrogenasen im Gewebe erreichen können. Inzwischen sind Methoden zum Nachweis weiterer Dehydrogenasen ausgearbeitet worden (Glycerinaldehydphosphat-, 3β-Hydroxysteroid- und 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase), die in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

4.341 Biochemie

Jede der nach dem Verfahren von HESS et al. demonstrierbaren Dehydrogenasen ist in eines der großen multikatalytischen Systeme der biologischen Oxydation eingeschaltet. Ihr histochemischer Nachweis kann als Indikator für die Gesamtaktivität dieser Enzymketten gelten. Im einzelnen verteilen sich die obengenannten Dehydrogenasen auf die Glycolyse (Alkohol-, α-Glycerophosphat- und Milchsäure-Dehydrogenase), den Citronensäurecyclus (Äpfelsäure- und Isocitronensäure-Dehydrogenase), den Pentosephosphatcyclus (Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase), die β-Oxydation der Fettsäuren (β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase) und die oxydative Desaminierung (Glutaminsäure-Dehydrogenase). Einige biochemische Merkmale dieser Enzyme werden im folgenden kurz dargestellt.

A. Alkohol-Dehydrogenase

Das Ferment konnte von HOLZER und SCHNEIDER (1955) aus Lebergewebe isoliert werden. Seine Substratspezifität ist relativ gering. Unter anderem katalysiert es die Dehydrierung von Aethylalkohol zu Acetaldehyd und von Glycerin zu Glycerin-

aldehyd. Das Ferment scheint in den meisten Geweben nur eine schwache Aktivität zu besitzen (PEARSE, 1961).

B. α-Glycerophosphat-Dehydrogenase

Es lassen sich 2 verschiedene Fermente unterscheiden, die α-Glycerophosphat in einer reversiblen Reaktion zu Phosphodioxyaceton dehydrieren:

a) Das sogenannte Baranowski-Ferment wird im Cytoplasma gefunden und arbeitet mit DPN als Wasserstoffüberträger.
b) Das nach MEYERHOF und GREEN benannte Enzym ist in den Mitochondrien lokalisiert und enthält als Coferment eine Flavinkomponente.

Nach BÜCHER u. KLINGENBERG (1958) sind beide Enzyme an der Übertragung von Wasserstoff aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien wesentlich beteiligt. Der durch die beiden Dehydrogenasen katalysierte Wasserstofftransport von DPNH über α-Glycerophosphat auf die Atmungskette wird als α-Glycerophosphatcyclus bezeichnet.

Welches der beiden Fermente beim histochemischen Nachweis erfaßt wird, ist nicht geklärt. Auch ohne Zusatz von DPN zum Inkubationsmedium konnte eine geringe Formazanbildung im Gewebe nachgewiesen werden, die der Aktivität des Meyerhof-Green-Ferments entsprechen könnte.

C. Milchsäure-Dehydrogenase

Die Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure durch die Milchsäure-Dehydrogenase erfolgt vorwiegend unter anaeroben Bedingungen. Daher kann das Ferment als Indikator für die Stärke der anaeroben Glycolyse im Gewebe herangezogen werden.

Die Milchsäure-Dehydrogenase ist im Cytoplasma lokalisiert, als prosthetische Gruppe dient DPN.

D. Äpfelsäure-Dehydrogenase

Es wurde in Mitochondrien und im Cytoplasma je ein DPN-abhängiges Enzym gefunden, das Äpfelsäure in Oxalessigsäure überführt. Ein anderes Ferment, das sogenannte "malic enzyme", katalysiert unter Beteiligung von TPN die oxydative Desaminierung der Äpfelsäure zu Brenztraubensäure.

E. Isocitronensäure-Dehydrogenase

Es kann zwischen einem DPN- und einem TPN-gebundenen Enzym unterschieden werden, die beide Isocitronensäure zunächst zu Oxalbernsteinsäure dehydrieren und dann durch eine Decarboxylierungsreaktion in α-Ketoglutarsäure überführen.

Das DPN-abhängige Enzym wurde in Lebermitochondrien gefunden (PLAUT u.SUNG, 1954). Die mit TPN arbeitende Isocitronensäure-Dehydrogenase besitzt eine vierzigfach höhere Aktivität und läßt sich nach HOOGEBOOM u. SCHNEIDER (1950) zu 90 Prozent in den löslichen, extramitochondralen Fraktionen der Zelle nachweisen.

F. Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Die beiden Fermente katalysieren zwei aufeinanderfolgende Dehydrierungsschritte im Pentosephosphatcyclus:

Glucose-6-phosphat $\xrightarrow{-2H}$ 6-Phosphogluconat $\xrightarrow{-2H}$ 3-Keto-6-phosphogluconsäure

Der abgespaltene Wasserstoff wird in beiden Fällen auf TPN übertragen. Nach biochemischen Untersuchungen finden sich die Fermente im Cytoplasma der Zelle.

G. β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase

Diese stereospezifische Dehydrogenase wandelt die an Coenzym A gebundene D (-) β -Hydroxybuttersäure in Acetessigsäure-Coenzym A um. Als Wasserstoffüberträger dient DPN.

H. Glutaminsäure-Dehydrogenase

Die Glutaminsäure-Dehydrogenase stellt eine Verbindung zwischen Eiweißstoffwechsel und Citronensäurecyclus her, durch die Synthese und Abbau bestimmter Aminosäuren reguliert werden. Das DPN-gebundene Enzym katalysiert die reversible Umwandlung von L-Glutaminsäure in α-Ketoglutarsäure und Ammoniak (oxydative Desaminierung).

4.342 Bisherige Befunde im Ovar

Aus der Gruppe pyridinnucleotidgebundener Dehydrogenasen, die mit der von HESS et al. (1958) angegebenen Methode demonstrierbar sind, liegen Untersuchungen über die Lokalisation der Milchsäure- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Ovar vor.

Die Milchsäure-Dehydrogenase wurde von IKONEN et al. (1961) in menschlichen Ovarien nachgewiesen. Es fand sich eine hohe Fermentaktivität in der Theca interna reifender Follikel, sowie in den Granulosa- und Thecaluteinzellen der Corpora lutea. Primärfollikel zeigten eine mäßige Reaktion. Das Ferment entsprach in seinem Verteilungsmuster der DPNH-Diaphorase, hatte jedoch eine höhere Gesamtaktivität. Auch nach den von FUHRMANN (1963) an Ratten- und Kaninchenovarien durchgeführten Untersuchungen ergab sich für die Milchsäure-

Dehydrogenase eine der DPNH-Diaphorase entsprechende Aktivität im Gewebe. Die stärkste Farbstoffreaktion fand sich in den Primärfollikeln. Eine hohe Enzymaktivität ließ sich außerdem in Corpora lutea im Blüte- und Rückbildungsstadium, im interstitiellen Luteingewebe und im Oberflächenepithel nachweisen. Gefäße, Granulosa- und Thecazellschicht reifender und atretischer Follikel zeigten eine Reaktion von mittlerer Intensität. Beim histochemischen Nachweis der Glucose-6-phosphat- und der Milchsäure-Dehydrogenase im menschlichen Ovar durch DEANE et al. (1962) reagierte die Theca folliculi stärker als die Granulosa. In Corpora lutea menstruationis war eine höhere Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in den Granulosaluteinzellen als in den Thecaluteinzellen feststellbar, die Milchsäure-Dehydrogenase zeigte in beiden Formationen eine intensive Reaktion. Schwangerschaftsgelbkörper wiesen noch im 5.Monat der Gravidität eine hohe Aktivität beider Enzyme auf, wobei die relativ starke Reaktion in den Thecaluteinzellen beim Nachweis der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase auffiel. Am Geburtstermin waren beide Enzyme in ihrer Aktivität abgefallen.

4.343 Eigene Methodik

Die von HESS et al. (1958) angegebene Methodik ermöglicht die Darstellung von 10 verschiedenen Dehydrogenasen. Durch PEARSE (1961) wurde zusätzlich ein Verfahren zur Demonstration der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in die Histochemie eingeführt.

Substrat	Coenzym		Atmungs-inhibitor		Puffer		Tetrazo-liumsalz		$CoCl_2$	Mitochon-drien-schutz		Na-fluorid	Aqua dest.	Ink. zeit	untersuchtes Material	
1,0M	DPN 0,1M	TPN 0,1M	Azid	Cya-nid	Tris	Phos-phat	Nitro-BT	MTT	0,5M 0,05ml	$MgCl_2$	PVP	0,01M 0,05ml	ad 1 ml	Min.	Ova-rien	C.l. grav.
DL-ß-Hydroxybuttersäure, Natriumsalz	X		X			X		X	X	X	X		0,05	15	13	3
D-Glucose-6-phosphat. Di-Natriumsalz (85 %)		X	X		X			X	X	X	X	X	-	30	19	9
6-Phosphogluconat, purum, Bariumsalz (80%), 0,01M		X	X		X			X	X	X	X		0,05	30	15	8
DL -Isocitronensäure, puriss. Trinatriumsalz	X			X		X	X			X	X		0,1	30	12	8
L(-)-Äpfelsäure	X			X		X	X			X	X		0,1	30	12	4
L-Glutaminsäure, purum, mono-Natriumsalz	X			X		X	X			X	X		0,1	30	12	8
α-Glycerin, purum, mono-Natriumsalz	X			X	X		X			X	X		0,1	30	12	8
Äthanol	X			X	X		X			X	X		0,1	30	9	6
DL-Milchsäure, Natrium-salz, cryst. puriss.	X			X		X	X			X	X		0,1	30	15	10

Übersicht 8: Zusammensetzung der Inkubationsmedien beim Nachweis pyridinnucleotidgebundener Dehydrogenasen

A. Herstellung des Inkubationsmediums

Das Inkubationsmedium ist in seiner Grundzusammensetzung für alle 11 Fermente gleich und enthält folgende Substanzen:

Substrat (1,0 M)	0,1 ml
DPN oder TPN (1,0 - 0,1 M)	0,1 ml
Atmungsinhibitor (Amytal, Azid oder Cyanid; 0,1 M)	0,1 ml
$MgCl_2$ (0,05 M)	0,1 ml
Puffer (0,06 M Phosphat- oder 0,2 M Trispuffer; pH 6,8-7,0)	0,25 ml
Tetrazoliumsalz (MTT oder Nitro-BT; 1 mg/ml)	0,25 ml
Aqua dest.	ad. 1,0 ml
Polyvinylpyrrolidon (MG 11000)	75,0 mg

Die Cyanidlösung ist mit n-HCl auf einen pH-Wert von 7,0 einzustellen.

Dieses Standardmedium wird durch geringfügige Modifikationen den Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme angepaßt. In Übersicht 8 ist die Zusammensetzung der verschiedenen Inkubationslösungen zum Nachweis der 11 Dehydrogenasen angegeben. Hierzu sind einige Anmerkungen notwendig:

Da die Substratlösungen mit ihrem pH-Wert teilweise außerhalb des physiologischen pH-Bereichs liegen, ist eine Einstellung auf pH 7 mit Tris-Puffer (bei den Substraten β-Hydroxybutyrat, Isocitrat und Malat) beziehungsweise mit 0,1 M HCl (bei Na-α-Glycerophosphat) erforderlich. Ein beim Zusammentreffen von Cobaltchlorid und Phosphatpuffer auftretender Cobaltphosphatniederschlag wird vor dem Zusatz der übrigen Komponenten zum Inkubationsmedium abfiltriert.

Beim Nachweis der meisten Dehydrogenasen kommt es zu einer rückwirkenden Hemmung der Enzymreaktion durch die bei der Substratdehydrierung als Reaktionsprodukt entstehenden Carbonylverbindungen. Dieser Vorgang kann durch Cyanid, das als Carbonylabfangreagenz wirkt, verhindert werden. Die Anwendung der MTT-Cobalt-Methode in der Dehydrogenasenhistochemie ist auf die wenigen Dehydrogenasen (Glucose-6-phosphat-, 6-Phosphogluconat- und β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase) beschränkt, bei deren Nachweis kein Zusatz von Cyanid zum Inkubationsmedium erforderlich ist. Beim Zusammentreffen von Cobalt und Cyanid bildet sich nämlich eine Komplexverbindung der Formel $[Co(CN)_6]^{4-}$, die eine Spontanreduktion der Tetrazoliumsalze bewirkt (KELLER u. PARRY; 1956).

B. Ausführung der Reaktion

a) Frische Gefrierschnitte werden mit 0,1-0,2 ml Inkubationslösung bedeckt und bei 37 °C an der Luft inkubiert (Inkubationszeiten: siehe Übersicht 8).

b) Bei Vorhandensein von Cobaltphosphatpraecipitaten: Spülen der Schnitte in 1-prozentiger HCl 30 sec.

c) Fixation in 10-prozentiger Formol-Calcium-Lösung 10 Min.

d) Eindecken in Glyceringelee.
Bei Anwendung der MTT-Cobalt-Methode verhindert der Zusatz von 0,5 M Cobaltacetat zum Eindeckmedium ein frühzeitiges Auskristallisieren des Formazans im Gewebe.

4.344 Ergebnisse

Die untersuchten 11 pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen lassen sich mit Ausnahme der Äpfelsäure- und der β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase in allen Zellformationen des Ovars histochemisch nachweisen. In Bezug auf die absolute Stärke der Farbstoffreaktion im Gewebe ergeben sich für die einzelnen Enzyme unterschiedliche Befunde:

Eine hohe Gesamtaktivität weisen die Milchsäure-, die Glucose-6-phosphat-, die TPN-gebundene Isocitronensäure- und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase auf. Zu der Enzymgruppe mit mittlerer Aktivität zählen die Glutaminsäure-, die α-Glycerophosphat-, die Alkohol- und die DPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase. Ohne nachweisbare Aktivität im Ovar bleiben die Äpfelsäure- und die β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase.

Da die Enzyme innerhalb der einzelnen Gruppen jeweils nahezu dasselbe Verteilungsmuster im Gewebe aufweisen, erscheint es als vorteilhaft, die Befunde gruppenweise zusammenzufassen.

A. Enzyme mit hoher Aktivität

Unter den pyridinnucleotidgebundenen Dehydrogenasen weisen die Milchsäure- und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die höchste enzymatische Aktivität im Ovar auf. Die Stärke der Fermentreaktion entspricht derjenigen beim Nachweis der Diaphorasen. Die TPN-abhängige Isocitronensäure- und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase reagieren im gesamten etwas schwächer.

Das Ovarialstroma zeigt in den Fibrocyten der Rindenzone, in den Gefäßwänden und im Oberflächenepithel eine mittlere Aktivität; eine etwas geringere Farbstoffbildung findet sich in der Markzone.

In Primär- und Sekundärfollikeln läßt sich eine starke Reaktion im Plasma der Eizelle lokalisieren, die zu Beginn der Follikelatresie an Intensität zunimmt, um dann mit fortschreitendem Zerfall der Strukturen immer mehr zu schwinden. Der Bereich des Zellkerns bleibt in den Oocyten ausgespart. Eine stärkere Formazanablagerung in der Granulosazellschicht findet sich vorwiegend in der Zellperipherie.
Die TPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase weist in den Primär- und Sekundärfollikeln die geringste Aktivität unter den 4 Dehydrogenasen auf.

Die stärkste Fermentreaktion ist im Ovar in den Thecazellstrukturen nachweisbar, wobei die Theca interna atretischer Tertiärfollikel und von Corpora atretica thecalia besonders hohe Farbstoffwerte aufweisen (Abbildung 5). In reifenden Tertiärfollikeln liegt in der Theca interna eine dichtere Formazanablagerung vor als in der nur schwach positiven Granulosa. Nach der Ovulation läßt sich in beiden Gewebsformationen eine Zunahme der Fermentaktivität feststellen. Sowohl in Menstruations- als auch in Schwangerschaftsgelbkörpern reagieren die Thecaluteinzellen deutlich stärker als die Granulosaluteinzellen. Diese Aktivitätsunterschiede treten beim Nachweis der Milchsäure- und der TPN-gebundenen Isocitronensäure-Dehydrogenase besonders hervor (Abbildung 6 und 7b).Die intensive Farbstoffreaktion bleibt in den

Granulosaluteinzellen der Schwangerschaftsgelbkörper während des I.Trimenons in gleicher Stärke erhalten. Regressionsvorgänge sind histochemisch an der allmählichen Abnahme und an der unregelmäßigen Verteilung des Formazanniederschlags in den Zellen erkennbar. Am Ende der Schwangerschaft ist noch eine mittlere Enzymaktivität in den Granulosaluteinzellen vorhanden.

Thecaluteinzellen sind nur in den ersten Monaten der Gravidität in den Corpora lutea nachweisbar. Vier Wochen post ovulationem finden sich in den Schwangerschaftsgelbkörpern ausgedehnte Thecazellwucherungen, die im Zellplasma eine intensive Farbstoffreaktion aufweisen. In der 14.Woche der Gravidität unterscheiden sich die Thecazellstränge in ihrem Formazangehalt nur noch wenig von den Granulosaluteinzellen. In älteren Corpora lutea lassen sich Thecaluteinzellen nicht mehr erkennen. Die intensiven Farbstoffniederschläge, die in den Randbezirken von Corpora albicantia demonstrierbar sind und beim Nachweis der Milchsäure-Dehydrogenase besonders stark hervortreten (Abbildung 8a), scheinen die Lokalisation der Fluorocyten wiederzugeben. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen lassen jedoch erkennen, daß der Ort der Formazanablagerungen nicht den Bereichen mit starker Fettspeicherung in der Peripherie der Corpora albicantia entspricht (Abbildung 8b).

B. Enzyme mit mittlerer Aktivität

Die Aktivitätsunterschiede, die diese Enzymgruppe in den verschiedenen Gewebsformationen des Ovars aufweist, sind relativ gering. Lediglich in der Theca interna atretischer

Tertiärfollikel, in Corpora atretica thecalia und in Corpora lutea läßt sich eine intensivere Formazanbildung nachweisen. Die Thecaluteinzellen der Gelbkörper reagieren bei der Darstellung der Glutaminsäure- und der Alkohol-Dehydrogenase deutlich stärker positiv als die Granulosaluteinzellen. Bei der geringen Gesamtaktivität der Enzymgruppe fällt eine verhältnismäßig dichte Formazanablagerung im Ovarialbindegewebe auf, die vorwiegend in den Gefäßwänden und in den neugebildeten, in die jungen Corpora lutea einwachsenden Fibrocyten lokalisiert werden kann.

Ein charakteristisches Verteilungsmuster im Ovar läßt die DPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase erkennen. Das Enzym weist in atretischen Primär- und Sekundärfollikeln eine intensive Aktivität im Cytoplasma der Eizelle auf, die derjenigen der Diaphorasen gleichkommt, zeigt jedoch in den übrigen Geweben nur eine mäßige Farbstoffreaktion.

C. Enzyme ohne nachweisbare Aktivität

Der histochemische Nachweis der β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase in menschlichen Ovarien gelingt nicht. Dagegen läßt sich bei Kontrollversuchen eine intensive Formazanbildung in Leber- und Nierengewebe von Meerschweinchen demonstrieren. Weder in Ovarien noch in Kontrollschnitten ist eine Aktivität der Äpfelsäure-Dehydrogenase erfaßbar.

4.35 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Dieses in die Glycolyse eingeschaltete, DPN-gebundene Ferment katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehydphosphat in Glycerinsäurephosphat unter Bildung des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP). HIMMELHOCH und KARNOVSKY (1961) entwickelten eine Methode zum histochemischen Nachweis der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, mit der sie das Ferment in verschiedenen Organen der Ratte lokalisieren konnten. Im Ovar fand sich eine hohe Enzymaktivität im Stroma und im Oberflächenepithel. Eine relativ starke Reaktion war außerdem in der basalen Granulosazellschicht reifender Follikel demonstrierbar, während das übrige Follikelepithel und die Theca nur schwach reagierten.

4.351 Eigene Methodik

A. Das Untersuchungsmaterial bestand aus 5 Ovarien nichtschwangerer Patientinnen und aus 3 Corpora lutea graviditatis.

B. Herstellung der Substratlösung

Das Glycerinaldehydphosphat ist als Bariumsalz im Handel. Zur Gewinnung des reinen Substrats wurden die Bariumionen nach dem von HIMMELHOCH und KARNOVSKY (1961) angegebenen Verfahren mit Hilfe eines Ionenaustauschers (Dowex 50 x 2; Vernetzungszahl 200-400) entfernt. Die Substratlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

C. Zusammensetzung des Inkubationsmediums

(nach HIMMELHOCH und KARNOVSKY, 1961).

Glycerinaldehyd-3-phosphat ($3,6 \times 10^{-2}$ M)	0,3 ml
DPN (5 mg/ml)	0,25 ml
Nitro-BT (5 mg/ml)	0,2 ml
Phosphat-Puffer (0,2 M; pH 7,2)	0,5 ml
Äthylendiamintetraacetessigsäure, Di-Natrium-salz (6 mg/ml)	0,1 ml
Aqua dest.	0,25 ml

D. Ausführung der Reaktion

a) Trocknen der Schnitte bei Zimmertemperatur	3 Min.
b) Einstellen der Schnitte in Aceton (4°C)	20 Min.
c) Spülen in physiologischer Kochsalzlösung	
d) Inkubation bei 37°C	15 Min.
e) Kurzes Spülen in physiologischer Kochsalzlösung	
f) Einstellen der Schnitte in Baker's Formalin-Calcium (10 % Formalin, 2 % Calcium) bei 4°C	20 Min.
g) Spülen in physiologischer Kochsalzlösung	
h) Eindecken in Glyceringelee.	

4.352 Ergebnisse

In den untersuchten Ovarien und Schwangerschaftsgelbkörpern lassen sich mit der oben beschriebenen Methode auch nach längerer Inkubation keine wesentlich stärkeren Formazanablagerungen als in den ohne Substrat inkubierten Kontrollschnitten nachweisen. Versuche an anderen Organen (menschliche Placenta, Niere und Leber der Ratte) führten ebenfalls nur zu unspezifischen Befunden.

4.36 Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Die Klasse der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen umfaßt eine Reihe pyridinnucleotidgebundener Redoxenzyme, die an Steroidmolekülen die Oxydation alkoholischer Gruppen zu katalysieren vermögen. Der Vorgang ist reversibel und führt zu einem Gleichgewicht zwischen den an der Reaktion beteiligten Verbindungen, das nach TALALAY u. WILLIAMS-ASHMAN (1960) folgendermaßen dargestellt werden kann:

$$\text{Steroidalkohol}+\text{DPN}^+(\text{TPN}^+) \longleftrightarrow \text{Steroidketon}+\text{DPNH}(\text{TPNH})+\text{H}^+$$

Die einzelnen Steroid-Dehydrogenasen besitzen eine hohe Substratspezifität in Bezug auf Stellung und sterische Konfiguration der zu dehydrierenden Hydroxylgruppen. Einige dieser Enzyme konnten inzwischen isoliert werden. Aus tierischen Geweben gelang unter anderem die Darstellung einer 3β- und einer 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Literaturübersicht bei TALALAY und WILLIAMS-ASHMAN, 1960).

4.361 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase

4.3611 Biochemie

Die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase ist das Objekt eingehender biochemischer Untersuchungen gewesen. Dieses DPN-abhängige Enzym wurde erstmals von SAMUELS et al.(1951) in allen steroidhormonbildenden Geweben in hoher Konzentration nachgewiesen, scheint jedoch in den übrigen Organen so gut wie ganz zu fehlen. Es dehydriert Δ^5-3β-Hydroxysteroide, die

an C_{17} oder C_{19} ein Sauerstoffatom tragen, zu Δ^4-α,β-ungesättigten Ketonen (SAMUELS et al.,1951; SAMUELS und HELMREICH, 1956). Als biologische Substrate der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase wurden von SAMUELS et al. (1951) das Δ^5-Pregnenolon und das Dehydroepiandrosteron ermittelt. Bei der enzymatischen Umwandlung dieser beiden Intermediärprodukte in Progesteron beziehungsweise Δ^4-Androsten-3,17-dion entsteht an Ring A des Steroidskeletts die Δ^4-3-Ketogruppe, die sowohl das Progesteron als auch das Testosteron und die Nebennierenrindensteroide in ihrem Molekül enthalten. Die Oestrogenbildung scheint ebenfalls von der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase abhängig zu sein, denn das bei der Dehydrierung des Dehydroepiandrosterons entstehende Δ^4-Androsten-3,17-dion stellt ein wichtiges Intermediärprodukt der Oestrogensynthese dar (HARPER, 1959; Übersicht 3, S.12).

Da die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase an der Synthese aller Steroidhormone beteiligt ist, ermöglicht ihr histochemischer Nachweis die Lokalisation der endokrinen Aktivität im Gewebe, läßt jedoch keine Aussage über die Art des gebildeten Steroidhormons zu.

4.3612 Histochemie

Die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase ist neben der Succino-Dehydrogenase das histochemisch am besten untersuchte Redoxenzym des Ovars. Das Ferment, das direkt in die Steroidsynthese eingreift und nur in steroidhormonbildenden Organen vorkommt, ist ein spezifischer Indikator für die endokrine Aktivität ovarieller Gewebsformationen.

Ein erstes Verfahren zur histochemischen Darstellung der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase wurde von WATTENBERG (1958) entwickelt, der die von FARBER et al. (1956) ausgearbeitete Methode zum Nachweis der Diaphorasen und Dehydrogenasen entsprechend modifizierte. Die mit der Methode von WATTENBERG gewonnenen Befunde erwiesen sich als relativ unspezifisch. Da das Wirkungsoptimum der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase bei pH-Werten zwischen 8 und 8,4 liegt, hatte WATTENBERG für das Inkubationsmedium einen pH-Wert von 8,0 gewählt. Im alkalischen Bereich kommt es jedoch zu einer unspezifischen Reduktion der Tetrazoliumsalze (siehe Seite 41), welche die enzymatisch katalysierte Farbstoffreaktion überlagert.

Durch die Senkung des pH-Wertes im Inkubationsmedium auf 7,1 bis 7,4 konnten LEVY et al. (1959a) eine Reduzierung der unspezifischen Formazanproduktion im Gewebe erreichen. Der außerhalb des Wirkungsoptimums der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase liegende pH-Wert bedingt jedoch eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit, so daß Inkubationszeiten zwischen 1 1/2 und 2 Stunden notwendig werden. Da sich mit zunehmender Inkubationszeit die störenden Faktoren in einem biokatalytischen System verstärken, ist das Verfahren nach LEVY ebenfalls nicht als optimal anzusehen. Die unspezifische Tetrazoliumreduktion im Gewebe ist noch immer beträchtlich. Die Beurteilung der Befunde erfolgte daher nach den von ZIMMERMANN und PEARSE (1959) angegebenen Kriterien (siehe Seite 42) durch den Vergleich mit Kontrollschnitten, die ohne Substrat inkubiert wurden.

4.3613 Bisherige Befunde im Ovar

Eine Zusammenstellung der in der Literatur erhobenen Befunde über die Lokalisation der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Ovar ist in Übersicht 9 wiedergegeben. Übereinstimmend konnten alle Autoren eine hohe Enzymaktivität in den Corpora lutea sowie in den interstitiellen Zellen von Ratten- und Kaninchenovarien feststellen. Unterschiedliche Ergebnisse liegen über die Verteilung der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase in der Granulosa und Theca interna von Tertiärfollikeln vor. Alle anderen Zellstrukturen des Ovars reagierten negativ oder nur sehr schwach positiv.

WATTENBERG (1958) konnte eine Formazanablagerung in menschlichen Ovarien nur in den Corpora lutea, in Kaninchenovarien nur in den interstitiellen Zellen demonstrieren. In Rattenovarien reagierten beide Zellformationen positiv. Bei Untersuchungen an Nagetierovarien fanden LEVY et al. (1959 a,b) eine stärkere Enzymaktivität in den interstitiellen Zellen als in Corpora lutea und in der Theca interna von Tertiärfollikeln. Die Granulosa ließ nur bei Follikelatresie eine mäßige Farbstoffreaktion erkennen. TAYLOR (1961) bewertete die Aktivität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase in Rattenovarien unter gleichzeitiger Kontrolle des Progesteron- und Progestingehalts im Plasma und der Pregnandiolausscheidung im Harn. Bei 2 bis 4 Wochen alten Ratten zeigten die Theca interna und die interstitiellen Zellen die höchsten Farbstoffwerte, bei reifen Tieren waren die Gelbkörper während des Metoestrus und in der Gravidität besonders reich

Autor	Erscheinungsjahr der Arbeit	Untersuchungsmaterial	Lokalisation der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Ovar				
			Corpora lutea Blütestadium	Tertiärfollikel Granulosa in Atresie	Tertiärfollikel Theca interna	interstitielle Zellen	übrige Gewebe
Wattenberg	1958	menschliche Ovarien	++	Ø	Ø	-	Ø
		Kaninchen	Ø	Ø	Ø	+++	Ø
		Ratte	++	Ø	Ø	++	Ø
Levy et al	1959b	Ratte	++	+	++	+++	Ø
Levy et al	1959a	Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen	++	(+)	+	+++	Ø
Fuhrmann	1961	menschliche Ovarien	++	Ø	Ø	-	Ovarialstroma (+)
		Ratte, Kaninchen	++	Ø	Ø	+++	Ø
		Rind	+++	Ø	Ø	-	Ø
Ikonen et al	1961	menschliche Ovarien	+++	(+)	++	-	Primärfollikel (+)
Taylor	1961	juvenile Ratte, 2-4 Wochen alt	-	Ø	+++	+++	Ø
		Ratte	+++	Ø	++	++	Ø
Deane et al	1962	menschliche Ovarien	+++	(+)	+	-	Thecaluteinzellen ++
König	1962	menschliche Corpora lutea	+++	-	-	-	-
Fuhrmann	1963	Ratte, Kaninchen	+++	+	+++	+++	Ø
Goldberg et al	1963	menschliche Ovarien	+++	Ø	+	-	Thecaluteinzellen ++

Übersicht 9: Zusammenstellung der Literatur über den Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Ovar

(Beurteilung der Enzymaktivität: +++ hohe Aktivität, ++ mittlere Aktivität, + schwache Aktivität, Ø keine nachweisbare Aktivität)

an Formazan. Nach Choriongonadotropinbehandlung kam es bei hypophysektomierten Versuchstieren zu einer starken Zunahme der Farbstoffbildung in den zuvor negativ reagierenden interstitiellen Zellen. Der Plasmaprogesteronspiegel und die Pregnandiolausscheidung liefen der Enzymaktivität nahezu parallel. Eine vermehrte Formazanbildung in der Theca interna und in den interstitiellen Zellen nach Choriongonadotropingabe wurde auch von FUHRMANN (1963) bei infantilen und hypophysektomierten Ratten beschrieben. IKONEN et al. (1961), DEANE et al. (1962) und GOLDBERG et al. (1963) konnten übereinstimmend die 3 β -ol-Steroid-Dehydrogenase mit hoher Aktivität in menschlichen Corpora lutea, in geringerer Stärke auch in der Theca interna reifender und atretischer Tertiärfollikel nachweisen. GOLDBERG et al. fanden jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Arbeitsgruppen in der Granulosa atretischer Tertiärfollikel keine Formazanablagerungen. In jungen Corpora lutea übertraf nach den Beobachtungen von IKONEN et al. die Reaktion in den Thecaluteinzellen diejenige in den Granulosaluteinzellen. DEANE et al. und GOLDBERG et al. lokalisierten dagegen einen intensiveren Farbstoffgehalt in den Granulosaluteinzellen. Nach dem 3. bis 4. Schwangerschaftsmonat kommt es in Corpora lutea graviditatis zu einem allmählichen Abfall der Enzymaktivität (DEANE et al. 1962; KÖNIG, 1962).

4.3614 Methodik

A. Das Untersuchungsmaterial setzte sich zusammen aus 27 Ovarien und Corpora lutea menstruationis sowie 12 Corpora lutea graviditatis.

B. Zusammensetzung des Inkubationsmediums

(nach LEVY et al., 1959a)

Dehydroepiandrosteron (1 mM)	2,0 mg
Propylenglykol	0,5 ml
Nitro-BT (1 mg/ml)	1,0 ml
Nicotinamid (1,6 mg/ml)	0,7 ml
DPN (3 mg/ml)	0,8 ml
Phosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,2)	4,0 ml.

Das Propylenglykol dient als Substratlösungsmittel für das schlecht wasserlösliche Dehydroepiandrosteron. Nicotinamid verzögert als kompetitiver Hemmstoff die Zerstörung des DPN durch Nucleotidasen.

C. Ausführung der Reaktion

a) Inkubation frischer Gefrierschnitte bei 37°C 2 Std.
b) Fixation in 10-prozentigem neutralem Formol 10 Min.
c) Eindecken in Diatex.

4.3615 Ergebnisse

Eine Formazanbildung, die über die Eigenaktivität des Gewebes hinausgeht, findet sich beim Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase nur in den Gelbkörpern und in der Theca interna reifender und atretischer Tertiärfollikel. Die höchsten Farbstoffwerte weisen die Corpora lutea in der ersten Woche post ovulationem auf. Diese starke Reaktion bleibt in Schwangerschaftsgelbkörpern bis zum 3.Monat der Gravidität erhalten.

Danach ist ein langsames Absinken der Enzymaktivität bis zum Geburtstermin zu verzeichnen. Die Abnahme der Farbstoffreaktion erfolgt in den einzelnen Bereichen eines Gelbkörpers unterschiedlich rasch, so daß in älteren Corpora lutea stärker und schwächer reagierende Zellgruppen nebeneinander gefunden werden. Mit fortschreitender Rückbildung der Luteinzellen wird auch die Verteilung des Formazans in der Einzelzelle immer unregelmäßiger, wobei Verklumpungen der Farbstoffgranula auftreten.

Die Aktivität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase bleibt in den Thecaluteinzellen geringer als in den Granulosaluteinzellen, auch dann, wenn andere Dehydrogenasen in diesen Zellen eine intensive Reaktion zeigen (Abbildung 7a,7b und 9). In der Theca interna der Tertiärfollikel und in Corpora atretica thecalia ist die Formazanbildung nur mäßig stark. Primär- und Sekundärfollikel reagieren beim Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase negativ, ebenso die Fluorocyten, das Bindegewebe und die Granulosa der Tertiärfollikel.

4.3616 Substratspezifität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase

Beim histochemischen Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase konnte mit dem Substrat Dehydroepiandrosteron die stärkste Farbstoffreaktion im Gewebe erzielt werden. Das Δ^4-Pregnenolon zeigte sich wesentlich weniger wirksam (WATTENBERG, 1958; LEVY et al. 1959b; FUHRMANN, 1963). Weitere Steroide wurden auf ihre Substratwirkung hin untersucht. WATTENBERG (1958) erreichte mit Testosteron, Desoxycorticosteron, Cortison, Progesteron, 11-Desoxy-17-OH-corticosteron und Androsten-

3,17-dion keine Formazanbildung. Versuche mit 17 α- und 17 β-Oestradiol, mit Östron und Östriol verliefen ebenfalls negativ (FUHRMANN, 1963). Um die Substratspezifität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase weiter zu analysieren, wurden Gefrierschnitte nach der Methode von LEVY et al. (1959b) mit 20 verschiedenen Steroiden inkubiert, die mit Ausnahme des Testosterons und des Progesterons an C_3 des Pregnanmoleküls eine Hydroxygruppe trugen. Die Substratkonzentration im Inkubationsmedium betrug jeweils 1 mM. Zum Vergleich wurden Kontrollschnitte ohne Substrat inkubiert. Die Stärke der Farbstoffreaktion im Gewebe ließ sich nach folgendem Schema beurteilen:

+++ starke Aktivität	+ geringe Aktivität
++ mittlere Aktivität	Ø Reaktion entspricht der Eigenaktivität des Gewebes.

Die Befunde der Untersuchung sind in Übersicht 10 zusammengefaßt. Danach findet sich die stärkste Formazanreaktion bei der Verwendung der physiologischerweise als Intermediärprodukte metabolisierten Substrate Δ-5-Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron. Oxydiert werden jedoch auch strukturähnliche Substanzen, die neben der 3β-Hydroxygruppe an C_{17} oder C_{20} eine Ketogruppe tragen. Dagegen scheint eine zusätzliche Hydroxygruppe an C_{17} die Metabolisierung zu behindern (Δ-5-Pregnen-3β, 17α-diol-20-on). Die stereoisomere 3α-Gruppe wird ebensowenig angegriffen wie die 3-Hydroxygruppe am Oestrogen- oder Cholesterinmolekül.

Reaktionsstärke	Substrat
+++	Dehydroepiandrosteron =(Androstenolon)
+++	Δ^5-Pregnen-3β,21-diol-20-on
++	Pregnenolon
++	$\Delta^{5,16}$-Pregnadien-3β-ol-20-on
++	5α-Pregnan-3β-ol-20-on
++	Δ^5-Pregnen-3β,21-diol-20-on-21-acetat
++	16,17-Oxido-5α-pregnon-3β-ol-20-on
+	16,17-Oxido-Δ^5-pregnen-3β-ol-20-on
+	5α-Pregnan-3β,21-diol-20-on-21-acetat
+	Δ^5-Pregnen-3β,17α-diol-20-on
+	Diosgenin
ø	Oestriol
ø	Oestron
ø	Testosteron
ø	Progesteron
ø	Cholesterin
ø	essigsaures Salz des 17-Amino-Δ^5-androsten-3β-ols
ø	17ß-Oestradiol
ø	Digoxigenin
ø	Dehydrocholsäure

Übersicht 10: Klassifizierung von 20 Steroiden nach ihrer Substratwirkung auf die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase.

4.362 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

4.3621 Biochemie

Eine lösliche, DPN-abhängige 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase konnte von LANGER und ENGEL (1958) aus menschlichem Placentagewebe isoliert und teilweise gereinigt werden. Das Ferment besitzt eine hohe sterische Spezifität für die 17β-Hydroxygruppe von Steroiden mit aromatischem Ring A. Es katalysiert die reversible Umwandlung von 17β-Oestradiol in Oestron. Nach TALALAY und WILLIAMS-ASHMAN (1958) kann sowohl DPN als auch TPN die Coenzymfunktion des Enzyms übernehmen.

4.3622 Methodik

Die histochemische Darstellung der 17β-ol-Steroid-Dehydrogenase erfolgte nach einem von PEARSON und GROSE (1959) ausgearbeiteten Verfahren. Das Inkubationsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-Puffer (2M; pH 7,4)	20,0 ml
17β-Oestradiol (2µM)	0,01 mg
DPN (50µM)	0,66 mg
kristallines Rinderalbumin	50,0 mg
Nitro-BT	10,0 mg

Die Gefrierschnitte wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, in 10prozentigem Formalin fixiert und in Glycerin-Gelee eingedeckt.

4.3623 Befunde

Die mit der beschriebenen Methodik gewonnenen Befunde lassen sich nicht sicher verwerten. Die Stärke der Farbstoffbildung im Gewebe unterscheidet sich nur unwesentlich von der unspezifischen Formazanbildung in Kontrollschnitten nach Inkubation in einem substratfreien Medium. Auch durch eine Erhöhung der sehr geringen Substrat- und Coenzymkonzentration in der Inkubationslösung auf 1 mM läßt sich keine spezifische Wirkung der 17β-ol-Steroid-Dehydrogenase nachweisen.

5. Diskussion

Bei der Darstellung von Enzymen bietet die histochemische Untersuchungstechnik durch die weitgehende Schonung der Organ- und Zellstruktur die Möglichkeit einer exakten zellulären Enzymlokalisation. Darin liegt ein Vorteil gegenüber biochemischen Enzymbestimmungsverfahren, die vorzugsweise im Gewebshomogenat angewandt werden. Die Komplexität des histologischen Aufbaus eines Organs, die eine biochemische Analyse einzelner Gewebsformationen erschwert, stellt für histochemische Untersuchungen keine Schwierigkeit dar. Die Demonstration der enzymatischen Aktivität in situ gestattet in der Histochemie den direkten Vergleich des Enzymgehalts verschiedenartiger Zellen und Gewebe eines Organs. Auf diese Weise lassen sich die einzelnen Zellgattungen durch den Nachweis unterschiedlicher Enzymmuster differenzieren.

Da die Enzyme auf Grund ihrer Eigenschaft als Stoffwechselkatalysatoren als ein morphologisches Äquivalent der Zellfunktion angesehen werden können, ergeben sich aus dem Nachweis wechselnder Enzymmuster in verschiedenartigen Zellen Hinweise auf Unterschiede im Aktivitätszustand und in der funktionellen Potenz dieser Zellen. Die Aussagekraft eines histochemischen Befundes ist demnach davon abhängig, ob sich eine Korrelation zwischen der histochemisch faßbaren

Enzymreaktion und dem zugrundeliegenden funktionellen Geschehen mit hinreichender Sicherheit ableiten läßt.

Den in der vorliegenden Untersuchung erfaßten Oxydoreduktasen kommt als Indikatoren für die endokrine Aktivität des Ovars eine unterschiedliche Bedeutung zu. Vier der achtzehn untersuchten Enzyme zeigen bei Anwendung der beschriebenen Methoden keine spezifische Aktivität im Ovarialgewebe. Die negativen Ergebnisse beim Nachweis der Äpfelsäure- und der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase sind wohl auf methodische Fehler zurückzuführen, da sowohl im Ovar als auch in anderen Organen in keinem Falle eine Formazanbildung nachgewiesen werden konnte. Bei der Demonstration der 17β-ol-Steroid-Dehydrogenase erweist sich die Farbstoffreaktion im Gewebe als zu unspezifisch für eine einwandfreie Beurteilung. Die β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase läßt zwar bei Kontrolluntersuchungen in Leber- und Nierengewebe von Meerschweinchen, nicht jedoch im menschlichen Ovar, eine deutliche Aktivität erkennen. Bei der Bedeutung, die dem Lipidstoffwechsel im Ovar zukommt, ist als Ursache für den negativen Ausfall der histochemischen Reaktion ein Mangel an aktivierenden Faktoren im biokatalytischen System wahrscheinlicher, als ein völliges Fehlen dieses in die Fettsäuresynthese eingeschalteten Redoxenzyms.

Die TPN-spezifischen Enzyme (Glucose-6-phosphat-, 6-Phosphogluconat- und Isocitronensäure-Dehydrogenase) wirken als TPNH-Donatoren an der Biosynthese verschiedener Stoffwechsel-

produkte mit. TPNH-liefernde Reaktionen sind unter anderem an der Fettsäure- und Cholesterinsynthese aus Acetat, am Einbau von C-1-Fragmenten in Aminosäuren und Purinkörper (Literaturübersicht bei TALALAY und WILLIAMS-ASHMAN, 1958), sowie an der Oestrogensynthese aus Cholesterin beteiligt (RYAN, 1959). Eine hohe Aktivität dieser drei Enzyme kann ein Indikator für die Bildung von Steroidhormonen sein, dasselbe Enzymprofil findet sich jedoch auch als Zeichen einer unspezifischen anabolen Stoffwechselleistung.

Die in die großen multikatalytischen Systeme der biologischen Oxydation eingeschalteten Enzyme (Bernsteinsäure-, Milchsäure-, DPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase, DPN- und TPN-Diaphorase, Cytochromoxydase) sind eng mit dem Energiestoffwechsel korreliert. Die Höhe ihrer Aktivität kann daher als Maßstab für den Funktionszustand einer Zelle herangezogen werden.

Als einziges nachgewiesenes Enzym läßt sich die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase unmittelbar mit der endokrinen Aktivität des Ovars in Zusammenhang bringen, da sie direkt in die Steroidhormonsynthese eingeschaltet ist.

Unter Zusammenfassung aller in der vorliegenden Untersuchung mitgeteilten Befunde läßt sich für jede Zellformation des Ovars ein aus 14 Oxydoreduktionsfermenten bestehendes Enzymmosaik darstellen. Die Klassifizierung der einzelnen Enzyme nach ihrer Aktivität und ihrem Verteilungsmuster führt zur

Aufteilung der Oxydoreduktasen in drei Hauptgruppen:

Enzymgruppe A: 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase

Enzymgruppe B: DPN- und TPN-Diaphorase
Bernsteinsäure-Dehydrogenase
Milchsäure-Dehydrogenase
TPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Enzymgruppe C: Äpfelsäure-Dehydrogenase
Glutaminsäure-Dehydrogenase
α-Glycerophosphat-Dehydrogenase
Alkohol-Dehydrogenase
DPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase
Cytochromoxydase.

Eine positive Formazanreaktion beim Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase ist spezifisch für diejenigen Strukturen, die die Fähigkeit zur Steroidhormonsynthese besitzen. Die Enzyme der Gruppe B und C sind dagegen ubiquitär in allen Zellen des Ovars histochemisch faßbar, sie besitzen ein identisches Verteilungsmuster. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen lediglich in Bezug auf die absolute Stärke der histochemischen Farbstoffreaktion. Die Enzyme der Gruppe B lassen in den Geweben mit hoher Stoffwechselleistung eine starke Formazanbildung erkennen. Die Enzymgruppe C weist eine wesentlich schwächere Grundaktivität als die Gruppe B auf und zeigt relativ geringe Aktivitätsunterschiede in den einzelnen Zellformationen.

Für die Beurteilung der Reaktionsstärke in den verschiedenen ovariellen Organstrukturen wurde der Farbstoffgehalt im Stroma als Vergleichsbasis herangezogen, das von allen Ovarialgeweben die geringste Enzymaktivität aufweist. Diese schwache Formazanreaktion kann als Ausdruck des in jeder Zelle ablaufenden Grund- oder Erhaltungsstoffwechsels gedeutet werden.

Als Zeichen einer hohen Stoffwechselaktivität wurden intensive Farbstoffablagerungen beim Nachweis der Enzymgruppe B gewertet, deren Enzyme ohne Ausnahme in die großen multikatalytischen Systeme des Energiestoffwechsels eingeschaltet sind. Dieses Enzymprofil ist kennzeichnend für eine Reihe von ovariellen Gewebsformationen, deren erhöhter Energieumsatz mit besonderen funktionellen Leistungen in Zusammenhang gebracht werden kann.

Nach den Befunden der vorliegenden Untersuchung weisen folgende Ovarialstrukturen eine hohe Aktivität der in Gruppe B zusammengefaßten Enzyme auf:

Primär- und Sekundärfollikel
die Theca interna von Tertiärfollikeln
Corpora lutea menstruatinis et graviditatis
Zellgruppen in den Randzonen von Corpora fibrosa.

In Primär- und Sekundärfollikeln sind dichte Formazanablagerungen beim Nachweis der Enzymgruppe B nur im Plasma der Eizelle zu lokalisieren; der Zellkern bleibt von Farbstoffgranula ausgespart. Dieses intrazelluläre Enzymverteilungs-

muster liegt möglicherweise auch der Beobachtung von IKONEN et al (1961) zugrunde, die beim Nachweis der DPN-Diaphorase einen Ring von Formazangranula um die negativ reagierende Eizelle beschrieben haben. FUHRMANN (1963) fand in Ratten und Kaninchenovarien die höchste Aktivität der Milchsäure-Dehydrogenase und der DPN-Diaphorase in den Primärfollikeln lokalisiert.

Atretische Primär- und Sekundärfollikel heben sich färberisch noch etwas intensiver von dem umgebenden Stroma ab als intakte Follikel. Dieser Befund ist nur im ersten Stadium der Atresie zu erheben, solange die Eizelle noch deutlich erkennbar ist. Mit zunehmendem Zellzerfall geht der Farbstoffgehalt der Primär- und Sekundärfollikel rasch zurück.

Ein auffälliges Verteilungsmuster im Ovar weist die DPN-gebundene Isocitronensäure-Dehydrogenase auf. Dieses Enzym zeigt nur in atretischen Primär- und Sekundärfollikeln eine intensive Farbstoffbildung. In den übrigen ovariellen Gewebsformationen ist dagegen lediglich eine schwache Formazanreaktion demonstrierbar.

Reifende Tertiärfollikel lassen in der Theca interna eine starke histochemische Reaktion beim Nachweis der Enzymgruppe B erkennen. Die Farbstoffablagerungen sind nur im Cytoplasma lokalisiert. Der relativ große Zellkern enthält keine histochemisch faßbare Enzymaktivität und hebt sich als runde, scharf begrenzte zentrale Aufhellung deutlich vom intensiv angefärbten Zellplasma ab. Dieses histochemische und morphologische Bild ist kennzeichnend für alle Thecaluteinzellen

im Ovar. Unter diesem von SEITZ (1906) geprägten Begriff ist "eine bestimmte Art von modifizierten Stromazellen" (WATZKA, 1957) zusammengefaßt. Zu diesen auch als interstitielle Zellen bezeichneten mesenchymalen Strukturelementen des Ovars sind neben den Theca interna-Zellen reifender und atretischer Tertiärfollikel die Thecaluteinzellen der Corpora lutea, die als Corpora atretica thecalia bekannten Wucherungen der Theca interna atretischer Follikel, sowie epitheloide Zellen und Zellgruppen im Stroma ovarii zu zählen.

In den Randbezirken älterer Corpora albicantia bleiben Zellgruppen histochemisch erfaßbar, die dasselbe Enzymprofil bei der Darstellung der Enzymgruppe B aufweisen wie die Thecaluteinzellen. Die Identität dieser Zellen konnte nicht sicher abgeklärt werden; sie könnten jedoch mit den Fluorocyten identisch sein, deren Entwicklung aus Thecaluteinzellen diskutiert wurde (ROCKENSCHAUB, 1950). Nach den Untersuchungen von PFLEIDERER und DIEZEL (1959) treten Fluorocyten, die das Lipopigment Ceroid enthalten, etwa 2 bis 3 Wochen nach der Menstruation in Corpora albicantia auf und verschwinden erst nach weiteren 17 bis 23 Wochen wieder aus deren Umgebung. FORAKER und CRESPO (1961) hatten auf eine starke Formazanreaktion beim Nachweis der DPN-Diaphorase im Bindegewebe zwischen den Läppchen der Corpora albicantia hingewiesen. Möglicherweise handelte es sich dabei um Farbstoffablagerungen in den Fluorocyten.

Während sich die Enzyme der Gruppe B im Stratum granulosum von Primär- und Sekundärfollikeln histochemisch mit mittlerer Aktivität lokalisieren lassen, unterscheidet sich die Granulosazellschicht von reifenden Tertiärfollikeln in ihrem Farbstoffgehalt kaum von demjenigen der Stromazellen. Diese gegenüber der Theca interna vergleichsweise geringe Aktivität oxydativer Enzyme in der Granulosa von Tertiärfollikeln wurde bereits von FORAKER und CRESPO (1961), sowie IKONEN et al (1961) beim Nachweis der Succino-Dehydrogenase, von DEANE et al (1962) für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und von IKONEN et al (1961) für die DPN-gebundene Diaphorase beschrieben. Nach dem Follikelsprung wird histochemisch eine hohe Aktivität der in Gruppe B zusammengefaßten Redoxenzyme in den Granulosaluteinzellen junger Corpora lutea demonstrierbar. Die intensive Farbstoffreaktion schwindet in Corpora lutea menstruationis während des Rückbildungsstadiums rasch, bleibt dagegen in Corpora lutea graviditatis während des I.Trimenons in voller Stärke erhalten. Danach sind Regressionsvorgänge histochemisch an der Verklumpung und der ungleichmäßigen intrazellulären Verteilung der Farbstoffgranula bei langsamer allgemeiner Aktivitätsabnahme der Enzyme zu erkennen. Am Ende der Gravidität ist noch eine mittelgradige Farbstoffreaktion in den Granulosaluteinzellen nachweisbar. Aktivitätsunterschiede zwischen größeren Einzelbezirken eines Gelbkörpers sind zu diesem Zeitpunkt deutlich ausgeprägt.

Eine Differenzierung von Granulosa- und Thecaluteinzellen mit histochemischen Mitteln scheint auf Grund der verschieden

starken Formazanreaktion beim Nachweis bestimmter Redoxenzyme möglich zu sein. Die Thecaluteinzellen lassen bei der Darstellung der Enzymgruppe B eine intensivere Farbstoffreaktion erkennen als die Granulosaluteinzellen und zeichnen sich nach histochemischer Anfärbung zudem durch den auffallend großen, farbstoffreien Zellkern aus. Im Regressionsstadium der Corpora lutea menstruationis bleibt die hohe Enzymaktivität in den Thecaluteinzellen länger erhalten als in den Granulosaluteinzellen. In den Randbezirken von Schwangerschaftsgelbkörpern sind Thecazellverbände während der ersten 3 bis 4 Graviditätsmonate in wechselnder Ausdehnung nachweisbar. Die Enzymgruppe B reagiert während dieser Zeit in den Thecaformationen stärker als in den Granulosaluteinzellen. Im 5.Schwangerschaftsmonat finden sich kaum noch Thecaluteinzellen, die sich färberisch von den Granulosazellen abheben. Diese Beobachtung stimmt mit morphologischen Befunden überein, wonach Thecaluteinzellen nach dem 5.Graviditätsmonat in der Regel nicht mehr angetroffen werden (WATZKA, 1957). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen konnten DEANE et al (1962) die Glucose-6-phosphat- und die Milchsäure-Dehydrogenase noch im 5.Monat mit hoher Aktivität in beiden Gewebsformationen erfassen; die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase reagierte in Corpora lutea menstruationis in der Granulosa stärker. IKONEN et al (1961) beschrieben dagegen beim Nachweis der DPN-Diaphorase in jungen Schwangerschaftsgelbkörpern eine stärkere Formazanbildung in den Thecaluteinzellen.

Versuch einer funktionellen Deutung der Befunde

Die histochemische Darstellung eines Enzymspektrums von acht am Energiestoffwechsel beteiligten Oxydoreduktasen führt in der vorliegenden Untersuchung zu einer morphologischen Kennzeichnung bestimmter ovarieller Strukturen durch den Nachweis einer hohen Aktivität dieser in Gruppe B zusammengefaßten Enzyme. Dieses Enzymprofil, demonstrierbar in der Eizelle von Primär- und Sekundärfollikeln, sowie in Granulosalutein- und Thecazellen, weist auf einen gesteigerten Energiestoffwechsel hin, der als Zeichen besonderer funktioneller Leistungen in diesen Zellformationen gewertet werden kann. Damit ist auch eine indirekte Beziehung zur endokrinen Aktivität des Ovars gegeben. Weitere Bezugspunkte zwischen enzymatischer und hormoneller Aktivität lassen sich aus der Mitwirkung TPN-gebundener Dehydrogenasen als spezifische Wasserstoffdonatoren bei der Fettsäure- und Cholesterinsynthese ableiten. Umgekehrt ist jedoch auch eine Beeinflussung der Redoxenzyme durch die Ovarialhormone denkbar. Ein derartiger Effekt der Oestrogene auf eine Anzahl von Oxydoreduktasen ist in mehreren Erfolgsorganen dieser Hormone nachgewiesen worden (Zusammenfassung der Literatur bei DICZFALUSY und LAURITZEN, 1961). Vermutungen über die Angriffspunkte der Hormonwirkung ergaben sich aus der Darstellung einer durch Oestrogene stimulierten pyridinnukleotidabhängigen Transhydrogenase in Placentargewebe (VILLEE et al, 1960). Ungeklärt ist der Einfluß der Gonadotropine auf die biokatalytischen Systeme des Ovars.

Die Komplexität dieser Wechselwirkungen beschränkt die Aussagekraft der histochemischen Befunde beim Nachweis von Enzymen der biologischen Oxydation, die nur in Zusammenhang mit weiteren biochemischen und histochemischen Untersuchungsergebnissen zur Lokalisation hormoneller Aktivität herangezogen werden können.

Die älteren Methoden zur Demonstration der endokrinen Ovarialfunktion beruhen vorwiegend auf der Darstellung physikalischer oder chemischer Eigenschaften nicht spezifischer Lipoidsubstanzen (Literaturübersicht bei PFLEIDERER und DIEZEL; 1959). Mit dem biochemischen und histochemischen Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Gewebe durch SAMUELS et al (1951) und WATTENBERG (1958) ist erstmals ein sicheres morphisches Äquivalent der Steroidhormonsynthese faßbar geworden. Die exakte histochemische Lokalisation des Enzyms sichert den Nachweis der Potenz einer Zelle zur Steroidhormonsynthese. Ein negativer Ausfall der Farbstoffreaktion schließt diese Funktion nicht unbedingt aus, da limitierende Faktoren der Enzymreaktion in der histochemischen Versuchsanordnung nicht sicher auszuschalten sind.

Die positive Farbstoffreaktion beim histochemischen Nachweis der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Ovar ist in der vorliegenden Untersuchung auf wenige Gewebsformationen beschränkt. Eine hohe Aktivität des Enzyms läßt sich lediglich in den Granulosaluteinzellen der Corpora lutea demonstrieren. Wesentlich schwächere Formazanablagerungen werden in den Thecazell-

strukturen gefunden. Negativ reagieren das Stroma, die Eizelle und das Stratum granulosum von Primär- und Sekundärfollikeln, sowie die Zellkerne auch der Granulosaluteinund Thecazellen. Diese Befunde korrelieren im wesentlichen mit den in der Literatur aufgeführten Ergebnissen. Übereinstimmend wird von allen Autoren die starke Reaktion in den Granulosaluteinzellen bestätigt. Eine noch höhere Aktivität des Enzyms wird nur in den interstitiellen Zellen bei Ratten und Kaninchen beschrieben (Zusammenstellung der Befunde in Übersicht 9, Seite 74). In menschlichen Ovarien wird auf eine schwächere Formazanbildung in den Thecaluteinzellen als in den Granulosaluteinzellen der Corpora lutea hingewiesen (DEANE et al, 1962; GOLDBERG et al, 1963). Nicht einheitlich sind die mitgeteilten Befunde in den Granulosazellen der Tertiärfollikel, die entweder negativ (GOLDBERG et al, 1963) oder schwach positiv reagierten (IKONEN et al, 1961; DEANE et al, 1962).

Das Verteilungsmuster der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase im Ovar als Indikator einer Steroidhormonproduktion steht in Übereinstimmung mit den Vorstellungen über den Ort der Steroidsynthese in diesem Organ, erlaubt jedoch keine Aussage über die Art des gebildeten Hormons. Mit dem Auftreten der Steroid-Dehydrogenase in den Granulosazellen der Tertiärfollikel zum Zeitpunkt der Ovulation ist biochemisch ein starker Anstieg des Progesterons in diesen Zellen nachweisbar (ZANDER, 1957).

Als Oestrogenbildner werden die Thecazellen angesehen, die allerdings in funktioneller Abhängigkeit von den Granulosazellen stehen (FALCK, 1959).

In allen Zellformationen, in denen die 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase histochemisch erfaßbar ist, sind auch die Enzyme der Gruppe B in hoher Konzentration nachweisbar. Während die Farbstoffintensität in Granulosaluteinzellen für die Steroid-Dehydrogenase und die Enzymgruppe B nahezu identisch ist, besteht in den Thecastrukturen eine auffallende Diskrepanz zwischen der hohen Aktivität energieliefernder Enzyme und der mittelgradigen oder mäßigen Aktivität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase. In älteren interstitiellen Zellgruppen in der Umgebung der Corpora lutea bleibt die Enzymgruppe B noch mit starken Farbstoffablagerungen nachweisbar, auch wenn die Steroid-Dehydrogenase bereits negativ reagiert (Abb.7a,b). Es ist denkbar, daß diese Zellen zusätzlich zur Oestrogenproduktion "eine Hilfsfunktion erfüllen und im Dienste der Ernährung ... des Follikelepithels und der Eizelle stehen" (WATZKA, 1957). Die schwache Reaktion der Enzymgruppe B und das Fehlen der Steroid-Dehydrogenase in der Granulosa der Tertiärfollikel macht eine Hormonsynthese in diesen Strukturen unwahrscheinlich. Das Plasma der Eizelle weist dagegen eine hohe Konzentration energieliefernder Enzyme ohne Aktivität der 3β-ol-Steroid-Dehydrogenase auf. Es ist anzunehmen, daß der erhöhte Energieumsatz in der Eizelle als Grundlage für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge dient, da eine endokrine Funktion der Eizelle bisher nicht bewiesen werden konnte.

6. Zusammenfassung

Die histochemische Lokalisation von 18 Enzymen aus der Gruppe der Oxydoreduktasen im Ovar führt in der vorliegenden Untersuchung zu einer morphologischen Differenzierung der einzelnen Zellformationen auf Grund qualitativer und quantitativer Unterschiede im Enzymprofil. Als morphisches Äquivalent der endokrinen Funktion des Ovars kann der Nachweis einer 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Kombination mit der hohen Aktivität einer Gruppe von 8 am Energiestoffwechsel beteiligten Dehydrogenasen gewertet werden. Dieses Enzymprofil läßt sich den Thecazellstrukturen und den Granulosaluteinzellen zuordnen. Hinweise auf die Art des synthetisierten Steroidhormons ergeben sich aus diesen Befunden nicht. Die Substratspezifität der 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird unter Verwendung von 20 verschiedenen Steroidabkömmlingen geprüft. Von den 11 metabolisierten Steroiden weisen die physiologischerweise auftretenden Verbindungen Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron die stärkste Substratwirkung auf. Die histochemischen Befunde und ihre Aussagekraft in Bezug auf eine funktionelle Deutung werden an Hand der Literatur diskutiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGNER, K.: Verdoperoxidase. Acta physiol. Scand. 2, Suppl. 8 (1941).

2. ARVY, L.: Contribution a l'histoenzymologie de l'ovaire. Zschr. Zellforsch. 51, 406 (1960).

3. BERNSTORF, E.C.: Succinic dehydrogenase activity in the intrasplenic ovarian graft of the mouse. Anat. Rec., Philadelphia 133, 362 (1959).

4. BLASCHKO, H. and K. HELLMANN: Pigment formation from tryptamine and 5-hydroxytryptamine in tissues: A contribution to the histochemistry of amine oxidase. J. Physiol. 122, 419 (1953).

5. BÜCHER, T.H. und M. KLINGENBERG: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chem., Berlin 70, 552 (1958).

6. BURSTONE, M.S.: Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxidase. J. Histochem. Cytochem. 9, 59 (1961).

7. BURTNER, H.J., R.C. BAHN and J.B. LONGLEY: Observations on the reduction of tetrazolium salts in biological systems. J. Histochem. Cytochem. 4, 428 (1956).

8. CASCARANO, J. and B.W. ZWEIFACH: Factors influencing the histochemical demonstration of coenzyme-dependent dehydrogenases and diaphorases. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 309 (1959).

9. CRAWFORD, D.T. and M.M. NACHLAS: Evaluation of indophenol derivatives as reagents for demonstrating cytochrome oxidase in tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 6, 438 (1958).

10. DEANE, H.W., R.J. BARRNETT und A.M. SELIGMAN: Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. In: GRAUMANN, W. und K. NEUMANN: Handbuch der Histochemie. Bd. VII/1 Enzyme. Erster Teil. Stuttgart: Fischer 1960.

11. DEANE, H.W., B.L. LOBEL and S.L. ROMNEY: Enzymic histochemistry of normal human ovaries of the menstrual cycle, pregnancy, and the early puerperium. Amer. J. Obstetr. Gynec. 83, 281 (1962).

12. DICZFALUSY, E. und C. LAURITZEN: Oestrogene beim Menschen. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1961.

13. EHRLICH, P.: Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Berlin: Hirschwald 1885.

14. ERNSTER, L.: Diaphorase activities in liver cytoplasmic fractions. Fed. Proc. 17, 216 (1958).

15. FALCK, B.: Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. Acta physiol. Scand. 47, Suppl. 163 (1959).

16. FARBER, E., W.H. STERNBERG and C.E. DUNLAP: Histochemical localization of specific oxidative enzymes. I. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Histochem. Cytochem. 4, 254 (1956).

17. FORAKER, A.G. and J.Z. CRESPO: Amylophosphorylase and certain oxidative enzymes in the human ovary. Fertility and steril., N.Y. 12, 425 (1961).

18. FORAKER, A.G. and S.W. DENHAM: Neotetrazolium in determination of succinic dehydrogenase activity in the ovary. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 80, 132 (1952).

19. FORAKER, A.G., P.A. CELI and S.W. DENHAM: Dehydrogenase activity. I. In the ovary. Obstet. Gynec. 2, 407 (1953a).

20. FORAKER, A.G., S.W. DENHAM and M.H. JOHNSTON: Histochemical changes in irradiated ovaries. I. Succinic dehydrogenase activity. Arch. Path., Chicago 55, 147 (1953b).

21. FORAKER, A.G., S.W. DENHAM and D.D. MITCHELL: Formation of a labile pigment in rabbit ova during histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science 117, 449 (1953c).
- Succinic dehydrogenase and endogenous reductase activity in the rabbit ovary in pregnancy. J. Obstetr. Gynaec. Brit. Empire 62, 447 (1955).

22. FUHRMANN, K.: Über den histochemischen Nachweis der 3ß-ol-Steroiddehydrogenase-Aktivität in Geweben endokriner Organe. Zbl. Gynäk. 83, 565 (1961).
- Histochemische Untersuchungen über Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität in Nebennieren und Eierstöcken von Ratten und Kaninchen. Arch. Gynäk. 197, 583 (1963).

23. GLENNER, G.G., H.J. BURTNER and G.W. BROWN, jr.: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. J. Histochem. Cytochem. 5, 591 (1957).

24. GLENNER, G.G., H. WEISSBACH and B.G. REDFIELD: The histochemical demonstration of enzymatic activity by a nonenzymatic redox reaction. Reduction of tetrazolium salts by indolyl-3-acetaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 8, 258 (1960).

25. GOLDBERG, B., G.E. JONES and D.A. TURNER: Steroid 3ß-ol dehydrogenase activity in human endocrine tissues. Amer. J. Obstetr. Gynec. 86, 349 (1963).

26. GRÄFF, S.: Eine Anweisung zur Herstellung von Dauerpräparaten bei Anwendung der Naphtholblau-Oxydasereaktion mit einigen Bemerkungen zur Theorie und Technik der Reaktion. Zbl. allg. Path. 27, 313 (1916).
- Intrazelluläre Oxydation und Nadireaktion. Beitr. path. Anat., Jena 70, 1 (1922).
- Die mikromorphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. In: ABDERHALDEN, E.: Handbuch biologischer Arbeitsmethoden. Bd. IV/1, 93 (1936).

27. HAMPERL, H.: Über fluoreszierende Körnchenzellen (Fluorocyten). Virchows Arch. path. Anat. 318, 32 (1950).

28. HARPER, H.A.: Review of Physiological Chemistry. Los Altos: Lange 1959.

29. HESS, R., D.G. SCARPELLI and A.G.E. PEARSE: The cytochemical localization of oxydative enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 753 (1958).

30. HIMMELHOCH, S.R. and M.J. KARNOVSKY: The histochemical demonstration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 573 (1961).

31. HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Suggestions for a more rational classification and nomenclature of enzymes. Advances Enzymol., N.Y. 14, 219 (1953).

32. HOLZER, H. und S. SCHNEIDER: Funktion der Leber-Alkoholdehydrogenase. Angew. Chem., Berlin 67, 276 (1955).

33. HOOGEBOOM, G.H. and W.C. SCHNEIDER: Cytochemical studies of mammalian tissues. III. Isocitric dehydrogenase and triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of mouse liver. J. Biol. Chem., Baltimore 186, 417 (1950).

34. IKONEN, M., M. NIEMI, S. PESONEN and S. TIMONEN: Histochemical localization of four dehydrogenase systems in human ovary during the menstrual cycle. Acta endocr., K'hvn. 38, 293 (1961).

35. KEILIN, D. and E.F. HARTREE: Cytochrome oxidase. Proc. roy. Soc., London 125 B, 171 (1938).
- Cytochrome and cytochrome oxidase. Proc. Roy. Soc., London 127 B, 167 (1939).

36. KELLER, R.N. and R.W. PARRY: Modern developments: The electron pair bound and structure of coordination compounds. In: BAILAR, J.C.: The Chemistry of the Coordination Compounds, p 157. New York: Reinhold 1956.

37. KLEBS, E.: Oxydationsvorgänge und Wärmebildung im tierischen Körper. Cbl. med. Wiss. 6, 417 (1868).

38. KOELLE, G.B. and A. de T. VALK: Physiological implications of the histochemical localization of monoamine oxidase. J. Physiol. 126, 434 (1954).

39. KÖNIG, P.A.: Morphologische und histochemische Veränderungen des Corpus luteum in der Frühgravidität. (Vortrag Oberrhein. Ges. f. Gynäk., Baden-Baden 1962). Geburtsh. u. Frauenhk. 23, 98 (1963).

40. KOHN, A.: Morphologie der inneren Sekretion und der inkretorischen Organe. In: Handbuch der Physiologie. Bd. 16/I. Berlin: Springer 1930.

41. KREBS, H.A. and J.M. LOWENSTEIN: The tricarboxylic acid cycle. In: GREENBERG, D.M.: Metabolic Pathways. Vol. I. New York: Academic Press 1960.

42. LANGER, L.J. and L.L. ENGEL: Human placental estradiol-17ß dehydrogenase. J. Biol. Chem., Baltimore 233, 583 (1958).

43. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 14. Aufl. Berlin: de Gruyter 1959.

44. LEVY, H., H.W. DEANE and B.L. RUBIN: (a): Observations on steroid 3ß-ol dehydrogenase activity in steroid-producing glands. J. Histochem. Cytochem. 7, 320 (1959).
- (b): Visualization of steroid-3ß-ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology 65, 932 (1959).

45. LILLIE, R.D. and H.J. BURTNER: Stable sudanophilia of human neutrophil leucocytes in relation to peroxidase and oxidase. J. Histochem. Cytochem. 1, 8 (1953).

46. MAHLER, H.R.: Nature and function of metalloflavoproteins. Advances Enzymol., N.Y. 17, 233 (1956).

47. MAHLER, H.R. and D.G. ELOWE: Studies on metalloflavoproteins. II. The role of iron in diphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase. J. Biol. Chem., Baltimore 210, 165 (1954).

48. MALONE, T.E.: The cellular origin of the corpus luteum as revealed by the neotetrazolium reaction in the albino rat. J. Morph. 100, 1 (1957).

49. MASSEY, V.: The relation of diaphorase and cytochrome reductase. Biochem. J., London 69, 58 (1958).

50. MC SHAN, W.H., W.F. ERWAY and R.K. MEYER: Malic dehydrogenase and cytochrome oxidase of lutein and other ovarian tissues during pregnancy and lactation. Arch. Biochem. 16, 379 (1948).

51. MERKLIN, R.J.: TPN and DPN diaphorase in the pregnant mouse. Anat. Rec., Philadelphia 130, 338 (1958).

52. MEYER, R.K. and W.H. MC SHAN: Hormone-enzyme relationships. Recent Progr. Hormone Res., N.Y. 5, 465 (1950).

53. MEYER, R.K., W.H. MC SHAN and W.F. ERWAY: The succinic dehydrogenase activity of ovarian and lutein tissue. Endocrinology 37, 431 (1945).

54. MEYER, R.K., S.W. SOUKUP, W.H. MC SHAN and C. BIDDULPH: Succinic dehydrogenase in rat ovarian tissues during pregnancy and lactation. Endocrinology 41, 35 (1947).

55. MOOG, F.: Cytochrome oxidase in early chick embryos. J. Cellul. Comp. Physiol., Philadelphia 22, 223 (1943).

56. MORI, S., K. SHIRAKI, N. MUROHARA, A. SANO and S. MIYAO: On the relation between the sexual cycle of normal rats and fat oxydising granule contained in their sexual organs. Transact. Jap. Path. Soc. 19, 75 (1929).

57. MYRBÄCK, K.: Die biologische Oxydation. In: AMMON, R. und W. DIRSCHERL: Fermente, Hormone, Vitamine, 3. Aufl. Bd. I: Fermente. Stuttgart: Thieme 1959.

58. NACHLAS, M.M., S.I. MARGULIES and A.M. SELIGMAN: Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. J. Biol. Chem., Baltimore 235, 2739 (1960).

59. NACHLAS, M.M., D.G. WALKER and A.M. SELIGMAN: (b): A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 29 (1958b). - (c): The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 467 (1958c).

60. NACHLAS, M.M., D.T. CRAWFORD, T.P. GOLDSTEIN and A.M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of cytochrome oxidase with a new reagent for the nadi reaction. J. Histochem. Cytochem. 6, 445 (1958a).

61. NACHLAS, M.M., K.-C. TSOU, E. DE SOUZA, C.-S. CHENG and A.M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. 5, 420 (1957).

62. NOVIKOFF, A.B.: The intracellular localization of chemical constituents. In: MELLORS, R.C.: Analytical Cytology. Second Edition. P 69. New York, Toronto, London: Mc Graw-Hill 1959.

63. OKUNUKI, K.: Cytochrome oxidase. In: HAYAISHI, O.: Oxygenases. New York: Academic Press 1962.

64. OSTER, K.A. and N.C. SCHLOSSMAN: Histochemical demonstration of amine oxidase. J. Cellul. Comp. Physiol., Philadelphia 20, 373 (1942).

65. PADYKULA, H.A.: The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. Amer. J. Anat. 91, 107 (1952).

66. PEARSE, A.G.E.: Intracellular localization of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. J. Histochem. Cytochem. 5, 515 (1957). - Histochemistry. Theoretical and Applied. Second Edition. London: Churchill 1961.

67. PEARSE, A.G.E. and R. HESS: Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry. Experientia, Basel 17, 136 (1961).

68. PEARSON, B. and F. GROSE: Histochemical demonstration of 17-ß-hydroxysteroid dehydrogenase by use of tetrazolium salt. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 100, 636 (1959).

69. PECHMANN, H.v. und P. RUNGE: Oxydation der Formazylverbindungen. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 2920 (1894).

70. PERNER, E.S.: Zellphysiologische und zytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochrom-Oxydase in Allium-Epidermiszellen. Biol. Zbl. 71, 43 (1952).

71. PFLEIDERER, A.jr. und P.B. DIEZEL: Histochemische Untersuchung der Fette und Lipoide im Gelbkörper. Frankf. Zschr. Path. 70, 207 (1959).

72. PLAUT, G.W.E. and S.-C. SUNG: Diphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenase from animal tissues. J. Biol. Chem., Baltimore 207, 305 (1954).

73. RICHTERICH, R.: Enzympathologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958.

74. ROCKENSCHAUB, A.: Theca- und Stroma-Luteinzellen des Eierstockes als fluorescierende Körnchenzellen ('Fluorocyten'). Geburtsh. u. Frauenhk. 10, 829 (1950).

75. RÖHMANN, F. und W. SPITZER: Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 28, 567 (1895).

76. RUDOLPH, G.: Die Enzymhistochemie der DPN-Diaphorase, der TPN-Diaphorase und der Succinodehydrogenase. Acta Histochem. 10, 293 (1960).

77. RUTENBURG, A.M., M. WOLMAN and A.M. SELIGMAN: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technique. J. Histochem. Cytochem. 1, 66 (1953).

78. RYAN, K.J.: Metabolism of C-16-oxygenated steroids by human placenta: The formation of estriol. J. Biol. Chem., Baltimore 234, 2006 (1959).

79. SAMUELS, L.T. and M.L. HELMREICH: The influence of chorionic gonadotropin on the 3ß-ol dehydrogenase activity of testes and adrenals. Endocrinology 58, 435 (1956).

80. SAMUELS, L.T., M.L. HELMREICH, M.B. LASATER and H. REICH: An enzyme in endocrine tissues which oxidizes Δ^5-3 hydroxy steroids to α,β unsaturated ketones. Science 113, 490 (1951).

81. SCARPELLI, D.G., R. HESS and A.G.E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 747 (1958).

82. SCHULTZE, W.H.: (a): Die Oxydasereaktion an Gewebsschnitten und ihre Bedeutung für die Pathologie. Beitr. path. Anat., Jena 45, 127 (1909).
- (b): Über die Oxydasereaktion der Speichel- und Tränendrüsen. Verh. Dtsch. Path. Ges. 13, 235 (1909).

83. SEITZ, L.: Die Follikelatresie während der Schwangerschaft, insbesondere die Hypertrophie und Hyperplasie der Theca interna-Zellen und ihre Beziehungen zur Corpus luteum-Bildung. Arch. Gynäk. 77, 203 (1906).

84. SELIGMAN, A.M. and A.M. RUTENBURG: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science 113, 317 (1951).

85. SEMENOFF, W.E.: Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodehydrase in den Organen der rana temporaria. Zschr. Zellforsch. 22, 305 (1935).

86. SLATER, E.C.: The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations. Biochem. J., London 44, 305 (1949).

87. STRUVE, H.: Ueber die Einwirkung des activen Sauerstoffs auf Pyrogallussäure. Ann. Chem. Pharm. 163, 160 (1872).

88. SWEAT, M.L., D.L. BERLINER, M.J. BRYSON, C. NABORS, jr., J. HASKELL and E.G. HOLMSTROM: The synthesis and metabolism of progesterone in the human and bovine ovary. Biochim. biophysica acta, N.Y. 40, 289 (1960).

89. TALALAY, P. and H.G. WILLIAMS-ASHMAN: Activation of hydrogen transfer between pyridine nucleotides by steroid hormones. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 15 (1958).
- Mechanisms of hormone action. Participation of steroid hormones in the enzymatic transfer of hydrogen. Recent Progr. Hormone Res., N.Y. 16, 1 (1960).

90. TAYLOR, F.B.jr.: Histochemical changes in the ovaries of normal and experimentally treated rats. Acta endocr., K'hvn 36, 361 (1961).

91. THUNBERG, T.: Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen Enzyme. Scand. Arch. Physiol. 40, 1 (1920).

92. TSOU, K.-C., C.-S. CHENG, M.M. NACHLAS and A.M. SELIGMAN: Syntheses of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. J. Am. Chem. Soc. 78, 6139 (1956).

93. VANDE WIELE, R. and J.W. JAILER: Placental steroids. Ann. N.Y. Acad. Sc. 75, 889 (1959).

94. VELARDO, J.T.: Pacemaker action of ovarian hormones in reproductive processes: II. The estrogens and progesterones during pregnancy. Fertility and steril., N.Y. 11, 343 (1960).

95. VILLEE, C.A., D.D. HAGERMAN and P.B. JOEL: An enzymatic basis for the physiologic functions of estrogens. Recent Progr. Hormone Res., N.Y. 16, 49 (1960).

96. WATTENBERG, L.W.: Microscopic histochemical demonstration of steroid-3ß-ol dehydrogenase in tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 6, 225 (1958).

97. WATZKA, M.: Das Ovarium. In: MÖLLENDORFF, W. und W. BARGMANN: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. VII/1, Teil 3. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.

98. WINKLER, F.: Der Nachweis von Oxydase in den Leukozyten mittels der Dimethylparaphenylendiamin-Alphanaphthol-Reaktion. Fol. haemat. 4, 323 (1907).

99. ZANDER, J.: Die gestagen wirksamen Hormone im Organismus. Geburtsh. u. Frauenhk. 17, 876 (1957).

100. ZIMMERMANN, H. and A.G.E. PEARSE: Limitations in the histochemical demonstration of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases ('nothing dehydrogenase'). J. Histochem. Cytochem. 7, 271 (1959).

101. ZIMMERMANN, H. und D. PLATT: Experimentelle vergleichende Untersuchungen über qualitative und quantitative histochemische Darstellung von Dehydrogenasen und Diaphorasen. Histochemie 2, 125 (1960).

Abbildung 1

Corpus lut. grav. (13. Wo. p. o.)

Succino-Dehydrogenase
(Methode n. NACHLAS et al.)

Reaktion in den Thecaluteinzellen stärker als in den Granulosaluteinzellen

(73-fache Vergr.)

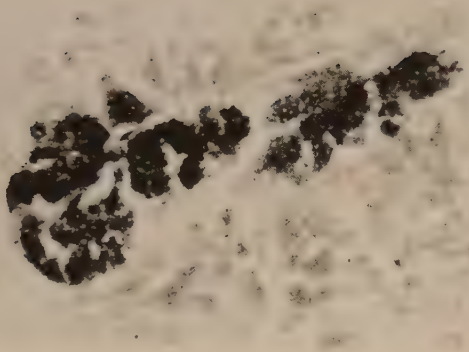


Abbildung 2

Corpus fibrosum

Succino-Dehydrogenase
(Methode n. NACHLAS et al.)

Hohe Enzymaktivität nur in den Fluorocyten nachweisbar

(18-fache Vergr.)

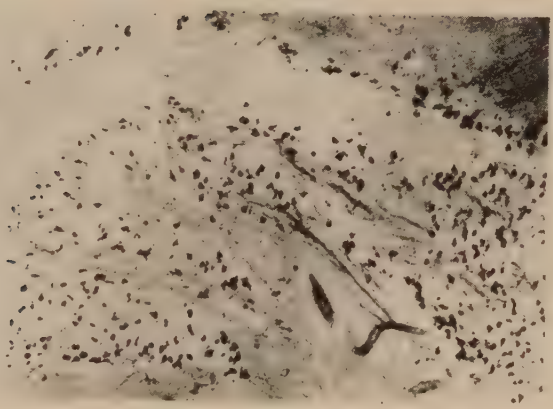


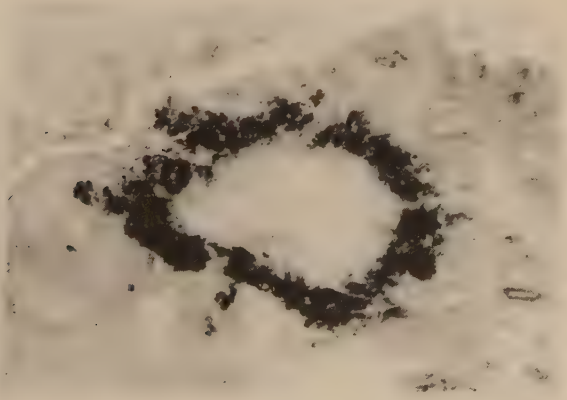
Abbildung 3

Atret. Teritärfollikel

TPN-Diaphorase
(Methode n. SCARPELLI et al.)

Starke Farbstoffreaktion in der Theca interna

(22-fache Vergr.)



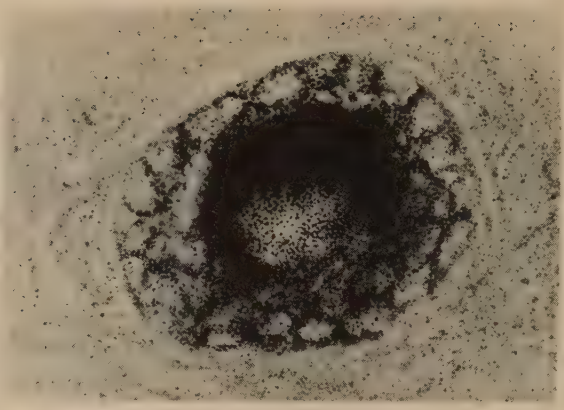


Abbildung 4

Sekundärfollikel

DPN-Diaphorase
(Methode n. SCARPELLI et al.)

Intensive Reaktion im
Plasma der Eizelle,
Zellkern negativ

(400-fache Vergr.)

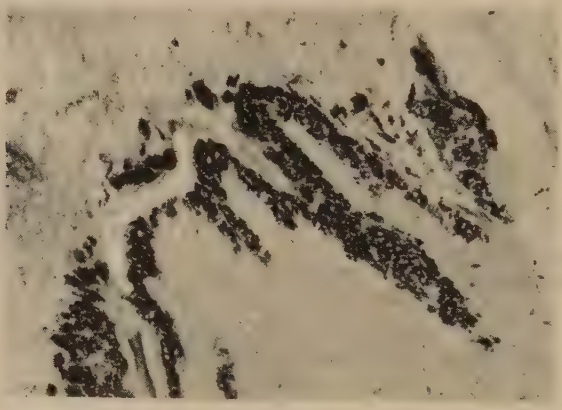


Abbildung 5

Corpus fibrosum

Milchsäure-Dehydrogenase
(Methode n. HESS et al.)

Thecazellstrukturen noch
stark positiv reagierend

(18-fache Vergr.)

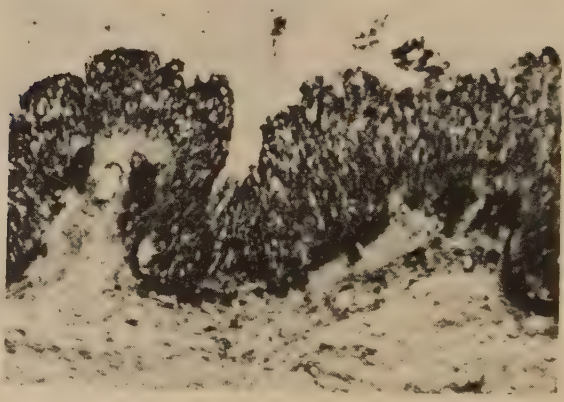


Abbildung 6

Corpus lut. menstr.

Milchsäure-Dehydrogenase
(Methode n. HESS et al.)

Höherer Farbstoffgehalt in
den Thecaluteinzellen als in
den Granulosaluteinzellen

(20-fache Vergr.)

Abbildung 7

Corpus lut. menstr.

Abb. 7a: 3ß-ol-Steroid-Dehydrogenase (Methode n. LEVY et al.)

Thecazellstrukturen nur schwach positiv reagierend

Abb. 7b: DPN-Isocitrat-Dehydrogenase (Methode n. HESS et al.)

Thecaluteinzellen intensiver gefärbt als Granulosaluteinzellen

(9-fache Vergr.)

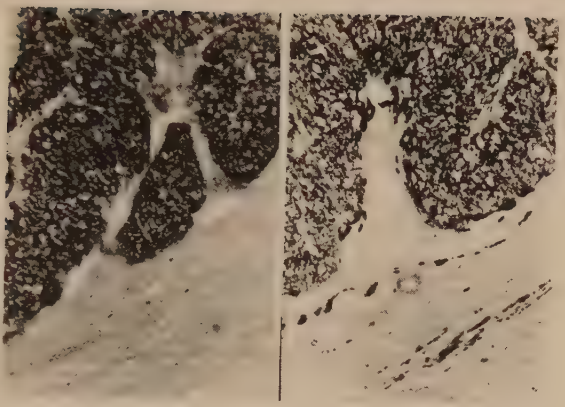


Abbildung 8

Reifender und atretischer Tertiärfollikel

Milchsäure-Dehydrogenase (Methode n. HESS et al.)

Abb. 8a: Starke Reaktion der Thecazellstrukturen

Abb. 8b: Polarisation: Lokalisation der Lipidsubstanzen entspricht nicht den Zellen mit hoher Enzymaktivität

(9,5-fache Vergr.)

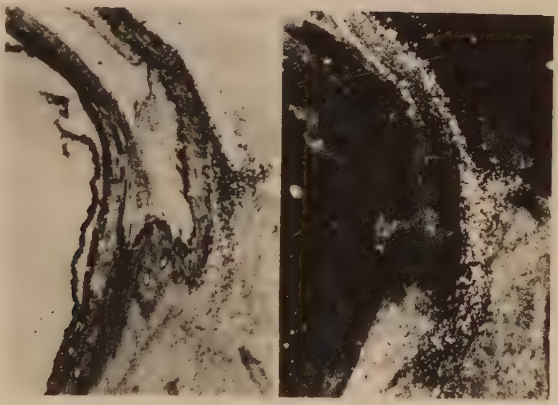


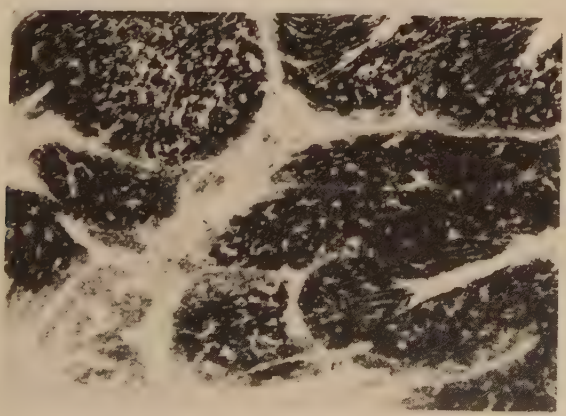
Abbildung 9

Corpus lut. grav. (mens II-III)

3ß-ol-Steroid-Dehydrogenase (Methode n. LEVY et al.)

Formazangehalt in den Thecaluteinzellen geringer als in den Granulosaluteinzellen

(19-fache Vergr.)



Lebenslauf

Am 14.2.1940 wurde ich, Wolfgang Röhm, als Sohn des ordentlichen Professors Dr. Helmut Röhm und seiner Ehefrau Marianne, geb. Hanselmann, in Stuttgart geboren. Im Jahre 1959 legte ich am Wilhelmsgymnasium Stuttgart die Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1959 mit dem Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Hier bestand ich 1960 die naturwissenschaftliche sowie 1962 die ärztliche Vorprüfung und legte 1966 das medizinische Staatsexamen ab. Nach Beendigung der Medizinalassistentenzeit im März 1968 war ich 18 Monate lang an der Städtischen Kinderklinik in Stuttgart-Berg tätig. Im September 1969 wurde ich zur Ableistung des Grundwehrdienstes als Stabsarzt zur Bundeswehr eingezogen.